

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Farmacología



TESIS DOCTORAL

**Contribución del Bisfenol a (BPA) en la inflamación y oxidación en el
paciente de hemodiálisis**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Enrique Bosch Panadero

Directores

**Jesús Egido de los Ríos
Sebastián Mas Fontao
Emilio González Parra**

Madrid, 2017

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA



**CONTRIBUCIÓN DEL BISFENOL A (BPA) EN LA
INFLAMACIÓN Y OXIDACIÓN EN EL PACIENTE EN
HEMODIÁLISIS**

ENRIQUE BOSCH PANADERO

MADRID, 2016

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

INVESTIGACION BIOMÉDICA

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA



**CONTRIBUCIÓN DEL BISFENOL A (BPA) EN LA
INFLAMACIÓN Y OXIDACIÓN EN EL PACIENTE EN
HEMODIÁLISIS**

ENRIQUE BOSCH PANADERO

**Directores: Jesús Egido de los Ríos, Sebastián Mas y Emilio González
Parra**

**Servicio de Nefrología e Hipertensión. Laboratorio Patología
cardiovascular, renal e hipertensión.**

Instituto de investigaciones sanitarias Fundación Jiménez Díaz

MADRID 2016



Don Jesús Egido de los Ríos, Catedrático de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid,
Don Emilio González Parra, Profesor contratado Doctor de la Universidad Autónoma de Madrid, y Don
Sebastián Mas Fontao, Profesor Doctor de la Universidad Autónoma de Madrid

CERTIFICAN

Que Don Enrique Bosch Panadero, Licenciado en Bioquímica por la Universidad Complutense de Madrid,
ha realizado bajo su dirección el trabajo titulado **"CONTRIBUCION DEL BISFENOL A (BPA) EN LA
INFLAMACION Y OXIDACION EN EL PACIENTE EN HEMODIALISIS."** que presenta como Tesis Doctoral
para alcanzar el grado de Doctor por la Universidad Complutense de Madrid.

Y para que conste, firmamos la presente en Madrid a 25 de Febrero de 2015.

Los directores de tesis,

Dr. Jesús Egido de los Ríos

Dr. Emilio González Parra

Dr. Sebastián Mas Fontao

AGRADECIMIENTOS

Pido disculpas de antemano si me olvido de alguien. Intentaré acordarme de todos!!!!

En primer lugar me gustaría dar las gracias al Dr. Jesús Egido por darme la oportunidad de poder realizar la tesis doctoral en este laboratorio. En segundo lugar a mis otros dos directores y también amigos, Sebas y Emilio. A ti Sebas, muchísimas gracias por darme la oportunidad de trabajar en investigación y en el laboratorio, y a ti Emilio, por contar conmigo desde el principio para embarcarme en este proyecto tan interesante que es el BPA. Hemos pasado juntos muy buenos momentos en estos dos ultimo años y espero siga habiendo. A los otros dos miembros del grupo “BPA” a Didier y a Pedro, con los que he compartido muy buenos ratos ya no solo en el ámbito laboral si no también en el personal (de comidas, cenas, cañitas, copas....)un placer trabajar con vosotros. Didi mucha suerte y animo!!! ya queda menos para ser médico!!!jejejeje También quiero agradecer a las enfermeras de la sala de hemodiálisis (Paula, María....), a los auxiliares de clínica, a Mónica por la ayuda que me han prestado y porque siempre que he bajo a pedir las muestras o cualquier otra cosa me reciben con una sonrisa... muchas gracias. También me gustaría agradecer al Dr. Ortiz por su ayuda en la revisión del paper. A Rosario por ayudarme siempre que se lo he pedido.

A ti Esther, muchas gracias. A ti Olha , te deseo lo mejor y animo!!! ya te queda menos!!! A Marta por ayudarme en todo lo que te he pedido y porque siempre te has preocupado no solo de tu grupo si no del resto de los predoctorales con los problemas que hayamos podido tener.

También quiero agradecer a Luis y Carmen su ayuda cuando se la he solicitado. A ti Jose Luis, pues que voy a decirte.. que eres un crack !! con eso te lo digo todo!! jejejeje

A ti Juan... madre mia.... no he visto en mi vida a una persona que se sepa tantos chistes!!!! Menudo figura estas hecho!!!! A Adrian, por todo este tiempo que he coincidido contigo y que la verdad me lo he pasado en grande.. sobre todo en las comidas y hablando del Barca!!!! A Tarín por tus comentarios desagradables!!! jejeje A Sergio, mi compañero de enfrente , que aunque tuve mis más y mis menos contigo, espero que te vaya todo muy bien!! A Cristian por su compañerismo, mucha suerte en todo!!!! A Iolanda, espero que te vaya genial y que tengas suerte!!!! A Carlota ... enhorabuena por tu tesis doctoral!! y mucha suerte en Oxford!!! A Juanma por tus chistacos y nuestros viajes en la blasa viendo a nuestra amiga en la 521!!!!

A Ernesto y a Alfonso por vuestra forma ser siempre que os he pedido cualquier cosa que he necesitado estabais allí!! Gracias!!!! A Maca por dejarme su tarjeta cada vez que bajo a comprar mis sandwichs jejeje ya te queda poco!!! A Raul... lo que me he podido reir contigo y con Rodrigo, jajajajaaj A Raquel, por siempre llevar una sonrisa al laboratorio y ser así de alegre!! A Olga por no pillar los chistacos , por ser rubia camuflada y por nuestras charlas en el ordenador sobre el gym, comida deportiva y otras muchas cosas más!! Estas en capilla para leer la tesis!! animo y suerte!! a Lara por ser tan agradable y natural!!! A Laura por ser ciudadana del mundo (españoloooooooo!!!!) a Elisa , aunque ya te fuiste tuvimos unos buenos años aquí en el laboratorio a pesar de nuestras diferencias. Suerte y enhorabuena por tu hijo. A Nuria que aunque ya no estas aquí fue un placer tenerte de compañera!! jejeje

Y como no.... A Sandra y Morgui, mis hermanos!! A ti Sandra por ser como eres, por guardar los abrigos tan bien (jejejeje) cariñosa, buena amiga, sincera, dulce , encantadora... podría ponerte mil adjetivos y aun así me quedaría corto!!!! No hay dos como tú!!!! Es difícil encontrar a una persona como tú y por eso lo valoro muchísimo más!!! No cambies nunca !! sabes que me tienes y me tendrás a tu disposición!!! y a ti

Morgui... hay mai!!!! qué voy a decir.. eres el hermano que nunca he tenido,, te mereces que la vida te de todo lo que quieras.. de las mejores personas que conozco, me llevo a un gran amigo y a un hermano!!! lo hemos pasado en grande y lo que nos queda!!! os adoro !!!! A Anita (Esbrit) o Toño siempre habéis estado ahí para resolverme cualquier duda que me haya surgido. Gracias!!!!

A Ricardo,Valva, Nerea, Melany , a las nuevas incorporaciones y a todos los ya no estáis aquí y he coincidido con vosotros que tengáis mucha suerte en todo lo que hagáis!!

A las auxiliares del labo (Pilar , Julia) siempre dejando el labo recogidito!!! Así da gusto!!! a Carmen por alegrarnos las tardes!! A Curra por enseñarme a usar el confocal y que cada vez que bajaba unas buenas risas!!!! A los del animalario, muchas gracias por vuestra ayuda atc...

A Edu , Javi Aparicio, Raúl, Angelito, Javi Hernando, Rudy, Jaime etc.... Esto también va por vosotros!!!

Y lo más importante es para mi familia, a la que me ha aguantado y apoyado en momentos difíciles durante la tesis!! A mi padre, que aunque no estés con nosotros sé que te hubiera gustado mucho estar apoyándome en este día, a mi madre por ser como eres, la mejor, a mis hermanas y cuñados porque siempre estáis ahí para lo que os necesite!!! Muchísimas gracias!!!

CLAVE DE ABREVIATURAS

Relación de abreviaturas que aparecen en el texto. En muchos casos se ha conservado la correspondiente abreviatura en inglés debido a su frecuente utilización en el lenguaje científico.

1,25 (OH)D ₃	Vitamina D
ARE	Elementos de respuesta antioxidante
BPA	Bisfenol A
CO	Cationes orgánicos
COX-2	Ciclooxygenasa-2
DES	Dietilestilbestrol
DP	Diálisis peritoneal
EMT	Transición epitelio mesénquima
EPIRCE	Epidemiología Insuficiencia Renal Crónica en España
ERC	Enfermedad crónica renal
ERCT	Enfermedad crónica renal terminal
FG	Filtrado glomerular
HD	Hemodiálisis
HDF	Hemodiafiltración
HF-PSU	Polisulfona de alto flujo

HO-1	Hemoxigenasa -1
IL-1 β	Interleuquina 1 β
IL-6	Interleuquina -6
KDIGO	Kidney disease improving global outcomes
Keap-1	Kelch-like ECH-associated protein 1
KoA	Coeficiente transferencia de masa
Kuf	Coeficiente de ultrafiltración
LF-PSU	Polisulfona de bajo flujo
NF κ B	Factor nuclear de transcripción κ B
Nrf-2	Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2
PCR	Proteína C reactiva
PEPA	Aleación de polímero de poliéster
PMb	Potencial de membrana
PN	Polinefrona
Prx-3	Peroxirredoxina -3
PS	Polisulfona
PTH	Parathormona
Pur-H	Policloruro de vinilo
ROS	Especies reactivas de oxígeno

SOD-1	Superoxido dismutasa-1
TFG	Tasa filtrado glomerular
TNF α	Factor necrosis tumoral α
TSR	Tratamiento sustitutivo renal
TX	Trasplante renal

INDICE

CLAVE DE ABREVIATURAS	12
I. RESUMEN	20
II. INTRODUCCIÓN	24
1. ENFERMEDAD RENAL CRONICA: DEFINICIÓN Y SITUACION ACTUAL	26
A. Definición de la Enfermedad Renal Crónica (ERC).....	26
B. Situación actual.	28
C. Características del paciente con enfermedad renal crónica en diálisis	29
• Alteraciones clínicas	29
• Alteraciones bioquímicas	31
• Proceso inflamatorio en enfermedad renal.....	31
• Especies reactivas de oxígeno (ROS). Estrés oxidativo	35
• Morbimortalidad.....	37
D. Técnicas de Hemodiálisis.....	40
• Hemodiálisis.	40
• Material usado en hemodiálisis. Composición.	41
• Principios físicos en la hemodiálisis.....	45
• Tipos de técnicas en hemodiálisis.....	46
E. Toxinas Urémicas.....	49
• Importancia clínica.....	50
• Depuración.	51
2. BISFENOL A.....	52
• Historia y Aplicación industrial.....	52
• Metabolismo.....	53
• Efectos a nivel celular.....	54
• Evidencias en modelos animales.....	55
• Evidencias en humanos.....	56
• Legislación.....	57
3. BISFENOL A EN LA ENFERMEDAD RENAL.....	58
• BPA como causa del daño renal.	58
• BPA en diálisis.....	59
III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	64
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	68
1. Técnica de dialisis.	70
2. Dializadores.	71
3. Líneas de sangre y monitores de diálisis.....	72

4. Estudio en pacientes.	73
• Población de estudio.....	73
• Diseño estudio prospectivo	74
• Obtención de muestras biológicas.	76
5. Parámetros bioquímicos.	78
6. Cultivos celulares.	80
7. Inmunofluorescencia con MitoSOX.....	81
8. Potencial de membrana mitocondrial.....	81
9. Caracterización células apoptóticas.	82
10. Análisis proteico.....	82
11. Cuantificación mediante ELISA	83
12. Técnica Western Bot.	83
13. Análisis expresión génica.	84
14. Análisis estadístico.	86
V RESULTADOS.....	88
1. Niveles de BPA en suero de pacientes en Hemodiálisis.....	90
2. Medida de niveles de BPA intracelular en controles sanos y en pacientes en Hemodialisis.	91
3. Membranas de dialisis con polisulfona incrementan los niveles de BPA en una sola sesión de Hemodialisis.	91
4. Medida de niveles de BPA en suero a la entrada (INFLOW) y a la salida (OUTFLOW) de la membrana de diálisis en único pase.	93
5. El uso crónico de la membrana de diálisis influye en la concentración de BPA en el suero de pacientes en Hemodiálisis.	93
6. El uso crónico de membranas de polisulfona aumenta BPA intracelular mientras que el uso con membranas de polinefrona disminuye los niveles de BPA.....	95
7. Marcadores de estrés oxidativo.	97
A. Membranas de polisulfona en pacientes en Hemodialisis incrementa la expresion de genes antionxidantes en PBMC's.	97
B. El uso de la membrana de polisulfona aumeta la expresion de proteínas Nrf2, HO-1 y Prx-1.	100
8. Marcadores de inflamación en PBMCs.....	102
A. Membranas de polisulfona aumenta la expresión de IL-6 y PCR en pacientes en Hemodiálisis	102

B. Membranas de polisulfona incrementan en PBMCs la expresion de genes inflamatorios IL-6 y TNFα	103
C. Membranas de polisulfona incrementan la expresion de citoquinas inflamatorias IL-6 y TNFα en PBMCs.	104
D. Correlacion entre los niveles de BPA en suero de pacientes en Hemodialisis y marcadores de IL-6 y TNFα.....	107
9. La exposición de BPA en células tubulares induce despolarización mitocondrial y apoptosis.....	108
10. BPA induce generación de ROS en células tubulares	111
VI DISCUSIÓN.....	112
A) BISFENOL (A) EN LA ENFERMEDAD RENAL CRONICA.	114
B) BISFENOL (A) Y MEMBRANAS DE HEMODIÁLISIS.....	120
C) INFLAMACION Y OXIDACION.....	126
VII CONCLUSIONES	134
VIII BIBLIOGRAFIA	138
IX. ANEXOS	158

I. RESUMEN

El bisfenol A (BPA) es un componente de algunas membranas de diálisis, que se acumula en la Enfermedad Renal Crónica (ERC). Estudios observacionales han demostrado que la exposición de BPA está vinculado a la lesión renal y cardiovascular en los seres humanos, y en estudios en animales se han descrito un nexo causal. Los riñones con función renal normal excretan rápidamente BPA, pero una excreción insuficiente en pacientes con ERC da lugar a la acumulación del BPA en el organismo. Utilizando un diseño cruzado, se estudió el efecto de la hemodiálisis con membranas de polisulfona (contienen BPA) y el uso de dializadores de polinefrona (sin BPA en su composición) en los niveles de BPA en 69 pacientes prevalentes en hemodiálisis: 28 pacientes iniciaron la diálisis con membranas de polisulfona durante tres meses y fueron cambiados a membranas de polinefrona durante otros tres meses. La misma metodología fue para los 41 pacientes que iniciaron la diálisis con membranas de polinefrona y transcurrido un periodo de tres meses fueron cambiados a membranas de polisulfona. Los resultados fueron agrupados para su análisis. La media de los niveles de BPA aumentó después de una sesión de hemodiálisis con dializadores de polisulfona pero no con dializadores polinefrona. El uso crónico (3 meses) de dializadores de polisulfona incrementó no de forma significativa los niveles de BPA en suero en la prediálisis, aunque presenta una tendencia a aumentar (de 48.8 ± 6.8 a 69.1 ± 10.1 ng / ml). El uso crónico de dializadores con polinefrona disminuyó los niveles de BPA en suero previo a la diálisis (de 70.6 ± 8.4 a 47.1 ± 7.5 ng / ml, $P < 0,05$). El BPA intracelular en PBMCs aumentó después de la hemodiálisis crónica con membranas de polisulfona (0.039 ± 0.002 a 0.043 ± 0.001 ng / 10^6 células, $P < 0,01$), pero disminuyó con membranas de polinefrona (0.045 ± 0.001 a 0.036 ± 0.001 ng / 10^6 células, $P < 0,01$). Además, en la hemodiálisis crónica con membranas de polisulfona aumentan los marcadores

relacionados con el estrés oxidativo y las concentraciones de marcadores inflamatorios en la sangre.

In vitro, trazas de membranas de polisulfona liberó más BPA en el medio de cultivo e indujo una mayor producción de citoquinas en PBMCs cultivadas con trazas de membranas de polinefrona. En conclusión, las membranas que presentan en su composición BPA puede contribuir al acumulo de BPA en los pacientes en hemodiálisis generando una respuesta inflamatoria crónica como consecuencia al estrés oxidativo generado similar a una toxina urémica.

SUMMARY

Bisphenol A (BPA), a component of some dialysis membranes, accumulates in Chronic Kidney Disease (CKD). Observational studies have linked BPA exposure to kidney and cardiovascular injury in humans, and animal studies have described a causative link. Normal kidneys rapidly excrete BPA, but insufficient excretion may sensitize patients with CKD to adverse the effects of BPA. Using a crossover design, we studied the effect of dialysis with BPA-containing polysulfone or BPA-free polynephron dialyzers on BPA levels in 69 prevalent patients on hemodialysis: 28 patients started on polysulfone dialyzers and were switched to polynephron dialyzers; 41 patients started on polynephron dialyzers and were switched to polysulfone dialyzers. Results were grouped for analysis. Mean BPA levels increased after one hemodialysis session with polysulfone dialyzers but not with polynephron dialyzers. Chronic (3-month) use of polysulfone dialyzers increase predialysis serum BPA levels, but do not reach statistical significance increase (from 48.8 ± 6.8 to 69.1 ± 10.1 ng/ml). Chronic use of polynephron dialyzers reduced predialysis serum BPA (from 70.6 ± 8.4 to 47.1 ± 7.5 ng/ml, $P < 0.05$). Intracellular BPA in PBMCs increased after chronic hemodialysis with polysulfone dialyzers (from 0.039 ± 0.002 to 0.043 ± 0.001 ng/106 cells, $P < 0.01$), but decreased with polynephron dialyzers (from 0.045 ± 0.001 to 0.036 ± 0.001 ng/106 cells, $P < 0.01$). Furthermore, chronic hemodialysis with polysulfone dialyzers increased oxidative stress and inflammatory marker concentrations in circulation.

In vitro, polysulfone membranes trace released more BPA in the culture medium and induced increased cytokine production in PBMCs cultured with trace polinefrona membranes. In conclusion, the membranes having in their composition BPA may

contribute to the accumulation of BPA in hemodialysis patients generating a chronic inflammatory response due to oxidative stress generated similar to a uremic toxin.

II. INTRODUCCIÓN

1. ENFERMEDAD RENAL CRÓNICA: DEFINICIÓN Y SITUACIÓN ACTUAL

La Enfermedad Renal Crónica (ERC) es un problema de salud pública importante^{1,2} y se asocia a una importante morbi-mortalidad cardiovascular, así como a costes muy significativos. Consiste en el deterioro progresivo e irreversible de la función renal. Cuando el filtrado glomerular (FG) desciende empiezan a aumentar la urea y la creatinina así como otras moléculas denominadas toxinas urémicas, aunque estos pacientes pueden estar asintomáticos o bien presentar anemia, hipertensión arterial, poliuria y nicturia.

Numerosos estudios observacionales han demostrado que el descenso de la tasa de filtración glomerular (TFG) y la proteinuria están asociados de forma independiente con un mayor riesgo de eventos cardiovasculares en poblaciones de pacientes que no fueron seleccionados en base a la presencia de patología renal o enfermedad cardiovascular conocida^{3,4}. La patología cardiovascular constituye la principal causa de mortalidad en los pacientes con ERC^{5,6}. Factores de riesgo cardiovascular tradicionales, como la hipertensión (que puede ir acompañado de hipertrofia ventricular izquierda), el tabaquismo, la diabetes, la dislipemia y la edad avanzada, tienen una alta prevalencia en la población con ERC^{4,7} y el número de estos factores de riesgo parece que se correlaciona con la gravedad de la disfunción renal⁷.

A. Definición de la Enfermedad Renal Crónica (ERC).

La ERC se define como la disminución de la función renal, expresada por un FG inferior a 60 ml/min/1,73 m² o como la presencia de daño renal de forma persistente durante al menos 3 meses. Esto supone:

1) Lesión renal diagnosticada por método directo (alteraciones histológicas en biopsia renal) o de forma indirecta por marcadores como la albuminuria o proteinuria, alteraciones en el sedimento urinario o alteraciones en pruebas de imagen.

2) Alteración del FG ($< 60 \text{ ml/min/1,73 m}^2$). El FG permite clasificar a los enfermos en diferentes estadios (Tabla 1). Siguiendo los criterios de las Guías de Práctica Clínica KDIGO, los estadios en la ERC se lleva a cabo midiendo el FG. (Tabla 1).

Categoría	FG	Descripción
G1	≥ 90	Normal o elevado
G2	60-89	Ligeramente disminuido
G3a	45-59	Moderadamente disminuido
G3b	30-44	Moderada a gravemente disminuido
G4	15-29	Gravemente disminuido
G5	< 15	Fallo renal
	Cociente Alb/Cre	
A1	< 30	Normal a ligeramente disminuido
A2	30-300	Moderadamente elevada
A3	> 300	Muy elevada

Tabla 1. Clasificación del Fallo Renal en función del filtrado glomerular.(Guías KDIGO)

Los estadios G4 y G5 se corresponden con la ERC. La diabetes mellitus representa la principal causa de Enfermedad Renal Crónica Terminal (ERCT), seguida por causas vasculares (Informe de Diálisis y Trasplante 2013, Registro español de Enfermos renales).

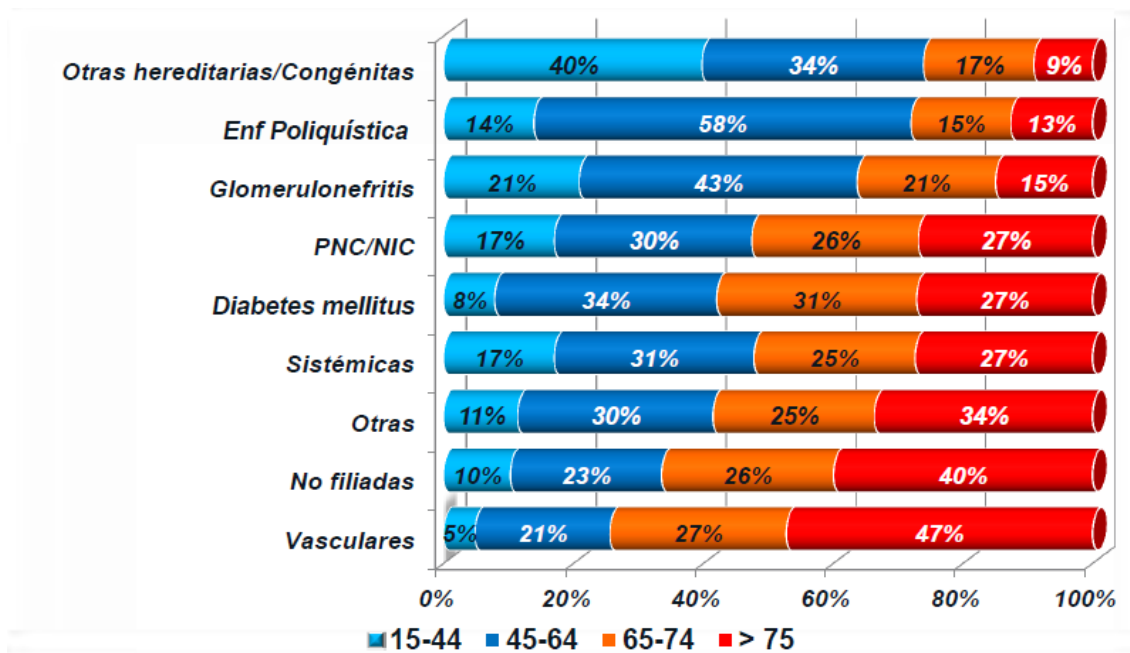


Figura 1. Principales causas de la Enfermedad Renal Crónica Terminal por grupos de edad. Registro Sociedad Española de Nefrología.

B. Situación actual.

Aproximadamente 4 millones de personas padecen ERC en España. De ellas unas 50.909 están en tratamiento renal sustitutivo, la mitad en diálisis y el resto con un trasplante renal funcional (Informe de Diálisis y Trasplante 2013dr). Cada año unas 6.000 personas con insuficiencia renal progresan hasta la necesidad de seguir uno de los tres tipos de tratamiento sustitutivo renal (TSR): hemodiálisis (HD) diálisis peritoneal (DP) y trasplante renal (Tx). La prevalencia de la ERC aumenta de forma progresiva con el envejecimiento y con otras enfermedades como la diabetes tipo 2, la hipertensión arterial y la arterioesclerosis⁸. La ERC se presenta asociada a cuatro patologías crónicas de alta prevalencia como son la diabetes, hipertensión arterial, insuficiencia cardiaca y cardiopatía isquémica, según evidencia el registro oficial de Diálisis y Trasplante de la Sociedad Española de Nefrología de 2013.

C. Características del paciente con enfermedad renal crónica en diálisis

- *Alteraciones clínicas.*

En fases iniciales de la ERC, los pacientes suelen estar asintomáticos. Cuando el FG disminuye por debajo de 30 ml/min, pueden aparecer ciertos síntomas como astenia y malestar general. Los síntomas que se pueden presentar en estos pacientes son:

- ❖ Manifestaciones cardiovasculares^{5,7} como hipertensión arterial. La causa fundamental es la retención hidrosalina, aunque también está implicada una situación de hiperreninemia (Tasa anormalmente elevada de renina en sangre).
- ❖ Alteraciones gastrointestinales
- ❖ Alteraciones hematológicas un signo precoz en la evolución de una insuficiencia renal crónica es la anemia, causada en gran parte por déficit de eritropoyetina⁹
- ❖ Alteraciones neurológicas, como la encefalopatía urémica¹⁰.
- ❖ Alteraciones osteomusculares¹¹ (osteodistrofia renal), se manifiesta por dolores óseos, deformidades (reabsorción de falanges distales en dedos), fracturas y retraso del crecimiento en niños.
- ❖ Alteraciones dermatológicas, el signo característico es el color pajizo de la piel, producido por la anemia y por el acúmulo de urocromos.
- ❖ Alteraciones hormonales. Se ve afectado el tiroides y por tanto la parathormona (PTH)⁹.

Por ello es importante la depuración de las sustancias tóxicas que el organismo genera por el metabolismo, y que en condiciones fisiológicas normales son eliminadas por el hígado y el riñón. Para ello se usa el FG y como método indirecto el parámetro de aclaramiento que se define como el volumen de plasma sanguíneo (en ml), que por efecto de la función renal, queda libre de la sustancia X en la unidad de tiempo (en minutos), donde X puede ser cualquier sustancia disuelta en la sangre que pueda llegar hasta el riñón. Habitualmente se usa la creatinina por eliminarse solo por el riñón. Una disminución del FG es causa suficiente para un aumento de la concentración de la creatinina del suero por lo que sugiere lesión renal. El desarrollo natural de la patología viene resumido de manera gráfica en la Tabla 2.

Disminución de la reserva de la función renal	100 %	Al disminuir el número de nefronas funcionales aumenta el filtrado de cada nefrona residual; se mantiene el balance externo de sodio, agua y la excreción neta de ácido.
Deterioro renal	50 %	Disminuye el filtrado de fósforo. La concentración de fósforo sérico se mantiene constante a expensas de elevar la PTH. Descenso de la 1,25 (OH)D ₃ .
Insuficiencia renal	25 %	Elevación de las cifras de fósforo sérico. Hiperparatoidismo. Osteodistrofia renal. Acidosis, uremia, anemia, hipocalcemia. Falta de concentración y dilución en la orina. Hiponatremia en caso de sobrecarga de H ₂ O. Astenia.
Uremia	10 %	Irritabilidad, letargo, anemia, lentitud intelectual, coagulopatía, inmunosupresión, amenorrea, prurito, neuropatía, vómitos etc..

Tabla 2. Evolución de la enfermedad renal crónica.

- **Alteraciones bioquímicas**

Las alteraciones bioquímicas de la ERC son múltiples. Incluyen alteraciones hidroelectrolíticas del sodio, potasio, y del equilibrio ácido base con acidosis metabólica. Igualmente alteraciones del metabolismo mineral como calcio, fósforo, vitamina D y PTH. Otras muchas alteraciones como anemia, acidosis y otras pueden aparecer.

Pero también existen alteraciones asociadas a dislipemia. Así, tener colesterol total, colesterol, LDL y triglicéridos elevados y/o un HDL bajo, aumenta la morbilidad y la mortalidad cardiovascular. La enfermedad renal también se asocia comúnmente a esta anormalidad de los lípidos del plasma, esto probablemente secundario a la actividad reducida de la lipasa de la lipoproteína evidente con FG menor de 50ml/min. La alteración más frecuente es la hipertrigliceridemia. La dislipemia acelera la progresión de la enfermedad renal por estímulo de la proliferación mesangial de la célula, expresión de las citoquinas inflamatorias, síntesis extracelular de la matriz y oxidación del LDL para generar aniones súper óxido dando lugar a estrés oxidativo.¹² Pero otras alteraciones muy usuales y que tienen una estrecha relación con el objetivo de la presente tesis son las alteraciones inflamatorias y oxidativas.

- ***Proceso inflamatorio en enfermedad renal.***

El paciente con insuficiencia renal presenta una situación de inflamación sistémica importante. Los niveles de marcadores de inflamación como son la proteína C reactiva (PCR), interleuquinas IL-1 β e IL-6 y factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) se encuentran elevados^{13, 14} en estos pacientes.

Durante los últimos años la inflamación crónica ha sido identificada como la responsable de un amplio rango de estados patológicos, como enfermedad cardiovascular, obesidad, diabetes, malnutrición e incluso envejecimiento ¹⁵. La ERC se caracteriza por un estado de inflamación crónica que parece estar relacionado con el estrés oxidativo, disfunción endotelial y calcificación vascular ¹⁶ siendo común entre los individuos con ERC moderada pero sobre todo en aquellos en estadios avanzados. Las razones por las que la ERC se asocia con un riesgo aumentado de inflamación crónica son complejas influyendo múltiples factores subyacentes, incluidos el medio urémico, aumento de citoquinas proinflamatorias circulantes, aumento de estrés oxidativo, pérdida energética proteico-calórica o mayor incidencia de infecciones crónicas.

La respuesta de fase aguda se define como la actividad fisiopatológica que acompaña a la inflamación. Aquellas proteínas cuyas concentraciones plasmáticas cambian al menos un 25% durante los estados inflamatorios se conocen como proteínas de fase aguda habiéndose descrito múltiples que pueden aumentar (PCR, amiloide sérico tipo A, fibrinógeno, haptoglobina, ferritina) o disminuir (albúmina, transferrina) en el proceso inflamatorio. Muchas de estas proteínas se sintetizan en el hígado en respuesta a infección, daño tisular, crecimiento neoplásico o desórdenes inmunológicos. Su función es ayudar a la defensa del huésped frente a estos daños, y también cambios neuroendocrinos (fiebre, anorexia, disminución de tiroxina, aumento de cortisol), hematopoyéticos (anemia, leucocitosis, etc) y metabólicos (pérdida de masa muscular, aumento de la lipólisis) dan lugar a la respuesta de fase aguda (Figura 2)

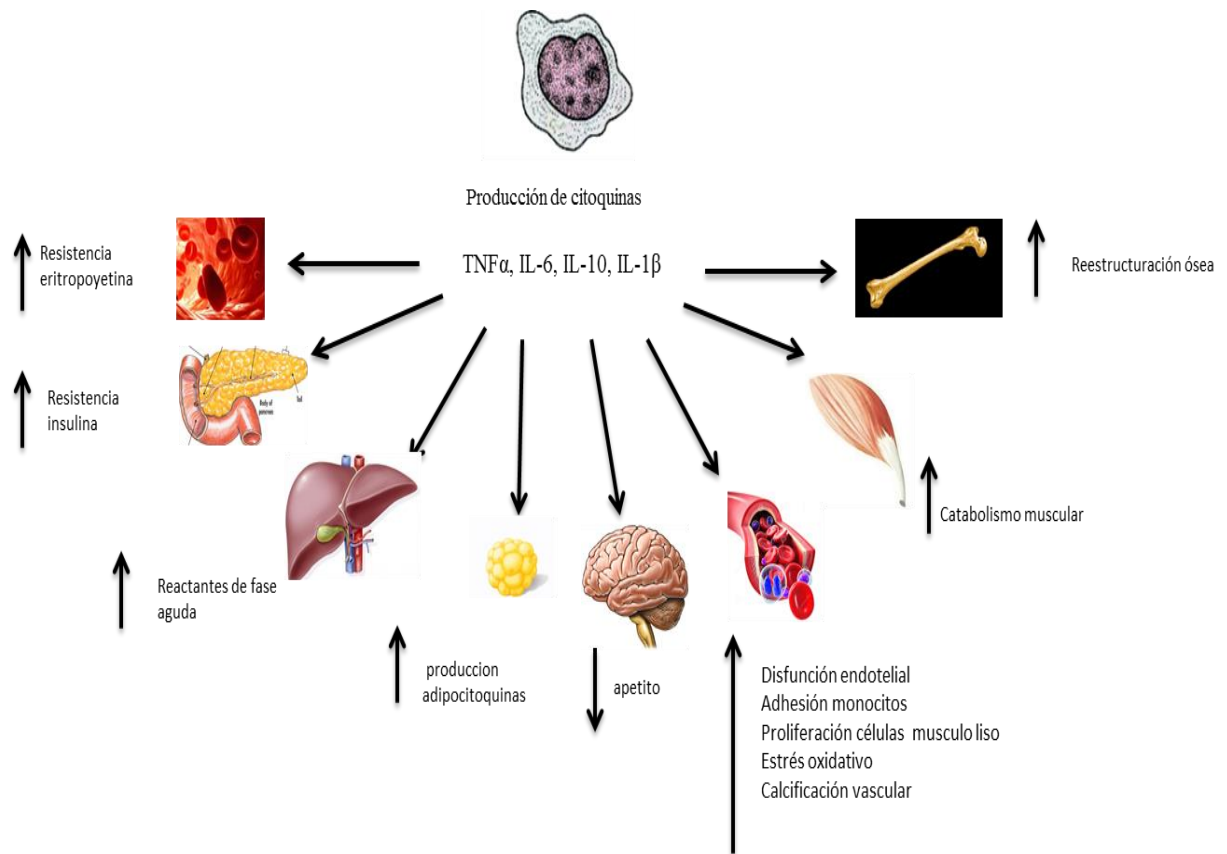


Figura 2. Acciones de las citoquinas proinflamatorias en la ERC. Adaptada de Stenvinkel y cols. *Kidney Int* 2005.

La medición de las proteínas reactantes de fase aguda es frecuentemente utilizada para definir la presencia y el grado de inflamación en un paciente. A pesar de denominarse reactantes de fase aguda, la respuesta de fase "aguda" puede persistir durante meses o años y convertirse en crónica. En esos estados de inflamación crónica, diversas proteínas de fase aguda positivas incluida la PCR ($< 1\text{mg} / \text{L}$) pueden encontrarse levemente o persistentemente aumentadas y predisponer a un aumento de enfermedad aterosclerótica. En general un aumento generalizado en la respuesta inflamatoria en los pacientes con disminución de la función renal puede producirse a través de los siguientes mecanismos:

- Disminución del aclaramiento de las citoquinas proinflamatorias y alteración del sistema inmune
- Sobrecarga de volumen con endotoxemia
- Aumento del estrés oxidativo
- Disminución de los antioxidantes
- Aumento de la presencia de comorbilidad
- Alteraciones en el metabolismo calcio-fósforo
- u otros factores: obesidad, resistencia a la insulina y factores genéticos

Por otro lado el deterioro de la función renal puede implicar una disminución en el aclaramiento de factores que intervienen en la inflamación. Así se ha visto que en pacientes con ERC la vida media sérica de la IL-6 , la IL-1 y TNF α es más elevada ^{17,18} reduciendo el aclaramiento proporcionalmente a la reducción del FG ^{19,20} y correlacionando negativamente con la función renal residual.^{21,22}. La sobrecarga de líquidos en pacientes con ERC conduce a la acumulación de endotoxinas como lipopolisacáridos y bacterias. A su vez estos procesos pueden estimular a los monocitos, produciendo una mayor síntesis de citoquinas proinflamatorias ²³⁻²⁵. Además las alteraciones del metabolismo calcio-fósforo aumentan el riesgo de calcificaciones vasculares que pueden actuar como un nido de respuesta inflamatoria local ²⁶.

- ***Especies reactivas de oxígeno (ROS). Estrés oxidativo***

El paciente con insuficiencia renal presenta una situación de oxidación, como demuestra el aumento de las especies reactivas de oxígeno^{27,28}.

Las ROS son productos del metabolismo normal de la célula. La producción de ROS intracelular puede ser, según el contexto, dañina o beneficiosa²⁹. Cuando ROS se producen a concentraciones bajas o moderadas los efectos son beneficiosos, participando en procesos fisiológicos como agentes anti infecciosos o como reguladores de diferentes vías de señalización intracelular. Los efectos tóxicos causados por los radicales libres se deben a los cambios estructurales y funcionales que se producen como consecuencia de la interacción de altas concentraciones de estas moléculas con elementos celulares normales, como los ácidos nucleicos, lípidos y proteínas, en un proceso denominado estrés oxidativo²⁹⁻³¹. Las ROS son moléculas pequeñas o fragmentos de moléculas que, en la mayor parte de los casos, contienen uno o más electrones desapareados en los orbitales moleculares³², poseen una vida media corta, porque el electrón o electrones desapareados son altamente reactivos, y por esta razón son denominados radicales libres. Las células generan energía aeróbicamente reduciendo el oxígeno molecular a agua. La enzima citocromo C oxidasa mitocondrial cataliza esta reacción que conlleva la transferencia de 4 electrones al oxígeno, dando lugar a diferentes ROS como el anión superóxido (O_2^-), el agua oxigenada (H_2O_2) y el radical hidroxilo ($\cdot OH$)(Figura 3).

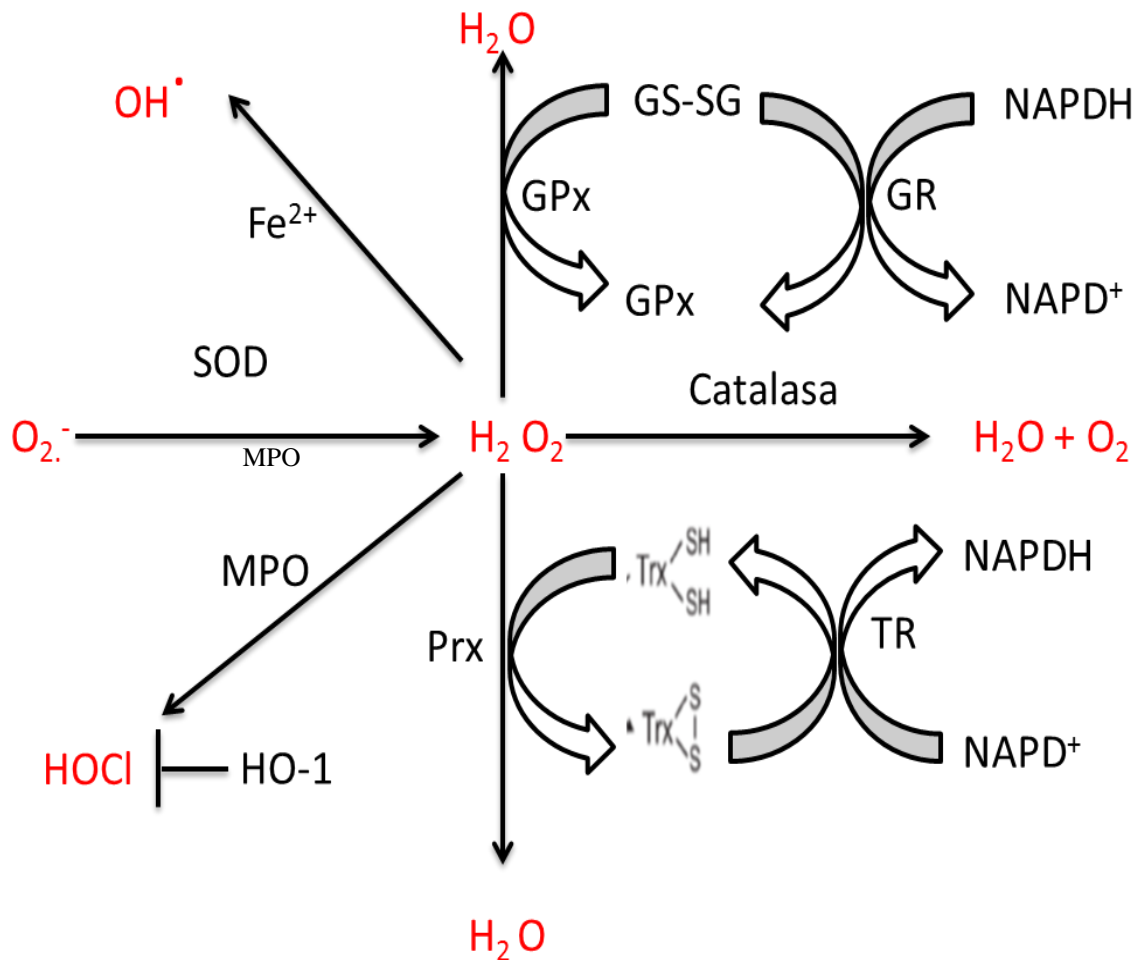


Figura 3. Especies reactivas (ROS) y sistemas antioxidantes celulares³³. MPO (Mieloperoxidasa)

El organismo posee mecanismos de protección frente al estrés oxidativo, pudiendo prevenir la generación de ROS, destruir los oxidantes una vez formados, o reparar los daños producidos por ellos. En condiciones fisiológicas la célula mantiene un delicado equilibrio entre la producción y la destrucción de ROS ³⁴. Los mecanismos de detoxificación pueden ser enzimáticos o no enzimáticos y se definen como sistemas antioxidantes (Figura 4) entre los que se encuentran principalmente el factor de transcripción Nrf-2 y la súper oxido dismutasa (SOD) .

Entre las principales fuentes de producción de ROS se encuentra la activación celular en los procesos de inflamación ³⁵. También se produce el efecto inverso, y los ROS pueden provocar efectos proinflamatorios. Por ejemplo, se ha demostrado que determinadas

ROS, como el peróxido de hidrógeno, activan el factor de transcripción de NF- κ B, promoviendo la síntesis de citoquinas pro-inflamatorias, dando lugar a una amplia cascada de la respuesta inflamatoria^{36,37}.

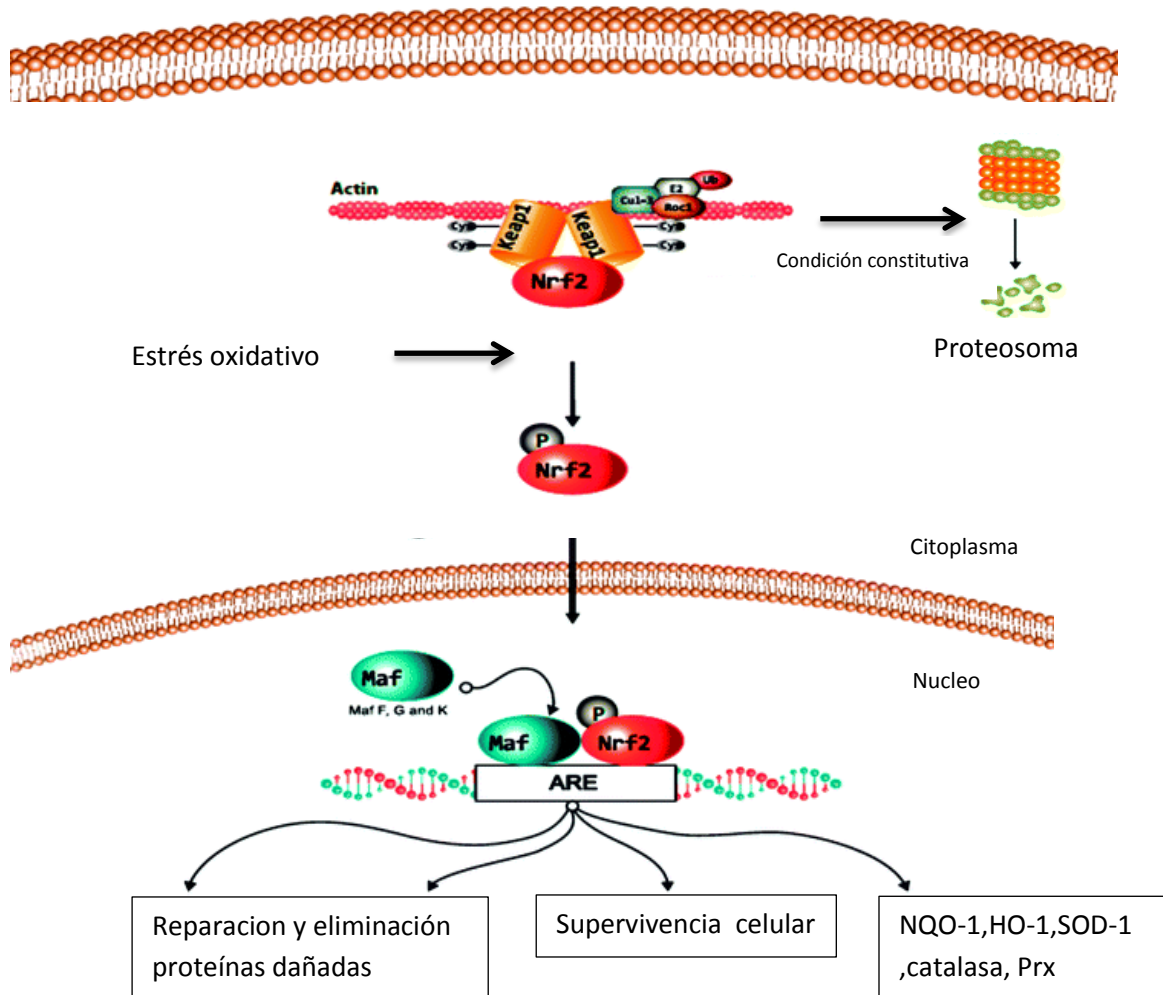


Figura 4. Respuesta Nrf2 a estrés oxidativo. Mecanismo de activación de Nrf2 y síntesis de diferentes enzimas antioxidantes.

- **Morbimortalidad.**

La tasa de mortalidad entre pacientes en diálisis es mayor que la de muchas enfermedades neoplásicas^{38,39}. Las causas principales de muerte entre los pacientes con ERC son la enfermedad cardiovascular y la infección. Durante la década de los 80 y

mediados de los 90, la albúmina sérica, y en general los parámetros que establecen el estado de nutrición, fueron considerados los mejores predictores de mortalidad en los pacientes con ERC. Bergström y colaboradores mostraron por primera vez el poder predictor de la PCR a sobre la mortalidad de estos pacientes. Zimmerman et al⁴⁰ encontraron que tanto PCR como albúmina eran predictores de todas las causas de mortalidad en pacientes en diálisis. Sin embargo, los niveles de PCR contribuyen más al riesgo de mortalidad y también sustituyen a la albúmina cuando se incluyen ambos en el modelo de regresión. Otro estudio informó que el 60% de los pacientes en HD que morían tenían aumentada la IL-6⁴¹ por encima del tercil superior. Por los hallazgos encontrados, tanto la IL-6 como PCR tienen mayor efecto que la albúmina en predecir la mortalidad, y cuando los tres parámetros se combinan en modelos de regresión múltiple, estos marcadores inflamatorios desplazan a la albúmina como predictores de pronóstico de forma que el aumento de los marcadores inflamatorios crónicos se asocia con un peor pronóstico y mayor mortalidad entre pacientes con ERC. La principal causa de muerte en la mayoría de los individuos con ERC son las enfermedades cardiovasculares por encima de la infección o la malnutrición. Quizás la mejor evidencia, que apoya la importancia de la inflamación en la patogenia de la aterosclerosis, proviene de la observación de que los pacientes sin enfermedad renal que presentan un aumento de marcadores de inflamación sistémica y de estrés oxidativo y se asocian con un mayor riesgo de aterosclerosis. La relación entre elevación de TNF- α y enfermedad cardiovascular y mortalidad no está tan clara como en el caso de la IL-6. Sin embargo, algunos estudios con una población muestral pequeña han mostrado que las concentraciones elevadas de TNF- α predicen la muerte en pacientes en diálisis⁴², además TNF- α es un factor pro aterogénico.

Los últimos datos de mortalidad (Registro español de trasplantes renales, 2013) revela que en los pacientes en hemodiálisis, diálisis peritoneal y pacientes trasplantados la mortalidad tiene un comportamiento lineal en los últimos años (Figura 5). Al desglosar los pacientes en función de la edades, hay un incremento de la mortalidad, ya sea en hemodiálisis, diálisis peritoneal o trasplantados (Figura 6).

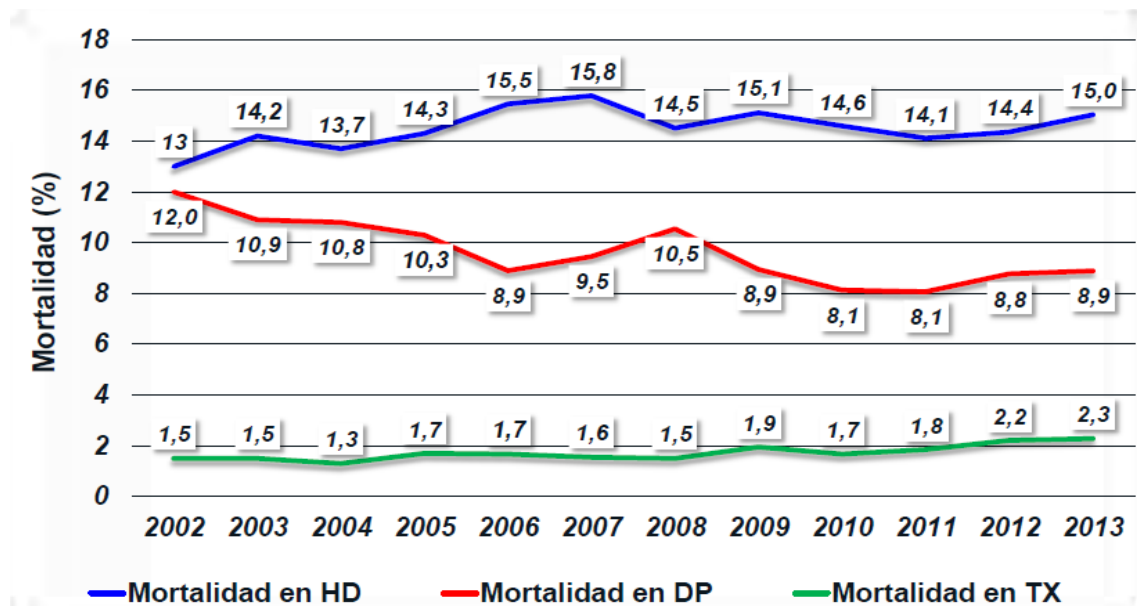


Figura 5 Representación gráfica de la mortalidad en pacientes sometidos a diálisis o trasplantados a lo largo de los años.

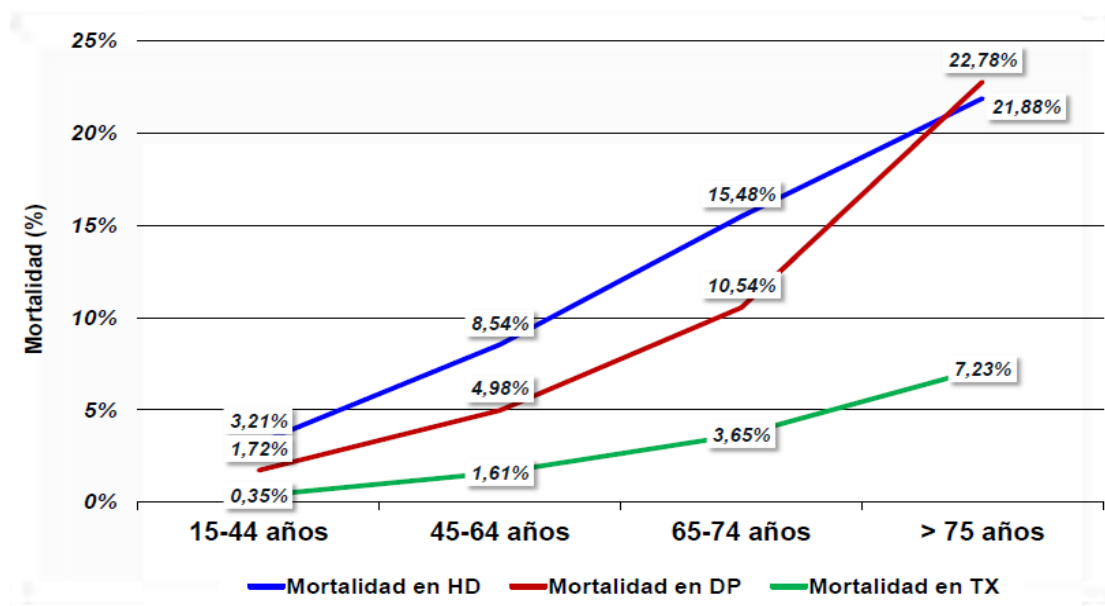


Figura 6. Representación gráfica de la mortalidad en pacientes sometidos a diálisis o trasplantados por grupos de edades.

D. Técnicas de Hemodiálisis.

- ***Hemodiálisis.***

Cuando fracasa el tratamiento conservador en el paciente, la sustitución temporal o definitiva de la función renal se hace por medio de la depuración extra renal y del trasplante renal. La diálisis es un fenómeno físico químico en virtud del cual la concentración de dos soluciones situadas a ambos lados de una membrana semipermeable tiende a igualarse. En relación a un gradiente de concentración, a la superficie filtrante, y al coeficiente de permeabilidad de la membrana. Es una técnica que sustituye la función uropoyética, pero no la endocrinometabólica del riñón. Existen diversos métodos de diálisis, entre los que podemos encontrar:

A. Hemodiálisis (HD)

B. Diálisis peritoneal (DP)

C. Hemofiltración

Tanto la HD como la DP son tratamientos dirigidos a sustituir la función renal pero no curan la Insuficiencia renal. Estos tratamientos aumentan la calidad de vida del paciente y le permiten vivir más tiempo. El único tratamiento que puede curar al paciente es el trasplante renal. La HD ayuda a controlar la tensión arterial y ayuda al organismo a mantener un balance adecuado de electrolitos (potasio, sodio, calcio) y bicarbonato.

- ***Material usado en hemodiálisis. Composición.***

El material usado en la HD y que está en contacto con la sangre es:

- Filtro o dializador:

El dializador, es la parte fundamental del sistema de depuración extracorpórea con hemodiálisis, siendo el compartimento donde se produce la eliminación de las toxinas urémicas retenidas y generadas por la insuficiencia renal crónica. El dializador, se compone de una carcasa de recubrimiento, que contiene una membrana semipermeable que separa dos compartimentos bien diferenciados, por donde circulan la sangre y el líquido de diálisis respectivamente. Los dializadores, se pueden clasificar de acuerdo a su diseño geométrico, según la composición de la membrana o de acuerdo a su capacidad de eliminar solutos de la sangre ⁴³. Continuamente se están introduciendo algunas modificaciones estructurales, tanto en la entrada de sangre como del líquido de diálisis, para incrementar su eficiencia depuradora ⁴⁴.

En lo que se refiere al tipo de membrana se pueden dividir, teniendo en cuenta su composición, en celulósicas, celulósicas modificadas y sintéticas. Aunque la tendencia actual es a definir las en relación a sus características y propiedades. En este sentido, se han agrupado de acuerdo a su grado de biocompatibilidad, permeabilidad, eficacia depuradora, distribución simétrica o asimétrica (según la distribución y el tamaño de los poros), polaridad, y sus propiedades hidrofílicas e hidrofóbicas ⁴⁵. La composición química y la capacidad de depuración, son las dos características que más se utilizan actualmente para su clasificación ⁴³. Así los dializadores se pueden clasificar por:

- a) Biocompatibilidad de la membrana:
- Membranas de celulosa o celulosa modificada. En general implican un menor grado de biocompatibilidad (excepto el triacetato de celulosa)
 - Membranas sintéticas. En general implican un mayor grado de biocompatibilidad
- b) Capacidad de ultrafiltración (permeabilidad convectiva): (En función del Coeficiente de Ultrafiltración (Kuf)):
- Membranas de Bajo Flujo. $Kuf < 12 \text{ ml/h/mm Hg}$
 - Membranas de Alto Flujo: $Kuf > 20 \text{ mL/h/mm Hg}$
- c) Eficiencia (permeabilidad difusiva): En función del coeficiente de Transferencia de Masa (KoA):
- Baja Eficiencia: $KoA < 600 \text{ ml/min}$
 - Alta Eficiencia: $KoA > 600 \text{ ml/min}$

Las membranas usadas para la realización del dializador son generalmente homopolímeros (Tabla 3).

<u>Membrane:</u> ELISIO™: Polynephron: Polyethersulfone (PES): BPA free Contains BPS Membrane treatment: Polyvinylpyrrolidone (PVP)*:BPA free No other Bisphenols <u>SureFlux™:</u> Cellulose triacetate (CTA): BPA free No other Bisphenols <u>Housing :</u> Polypropylene (PP): BPA free No other Bisphenols <u>Potting:</u> Polyurethane: BPA free Contains BPF				
Polyethersulfone (PES) BPS	Cellulose triacetate (CTA) Bisphenol free	Polyurethane BPF	Polypropylene (PP) Bisphenol free	Polyvinylpyrrolidone (PVP)* (membrane) Bisphenol free

<u>Membrane:</u>	Polysulfone (PS):	Contains BPA	Contains BPS
	Polyflux	BPA free	Contains BPS
	Polyester polymer alloy (PEPA)	Contains BPA	No other Bisphenols
	Polystyrene-butadiene	BPA free	No other Bisphenols
	Polymethylmethacrylate (PMMA)	BPA free	No other Bisphenols
	Ethylene vinyl alcohol copolymer(EVAL)	BPA free	No other Bisphenols
	AN69	BPA free	No other Bisphenols
<u>Housing :</u>	Polycarbonate (PC):	Contains BPA	No other Bisphenols
	Polystyrene	BPA free	No other Bisphenols
<u>Potting:</u>	Polyurethane:	BPA free	Contains BPF

Polycarbonate (PC) (housing) BPA	Polysulfone (PS) (membrane) BPA and BPS	Polyester polymer alloy (PEPA) (membrane) BPA
Polystyrene-butadiene (membrane) Bisphenol free		Polystyrene (housing) Bisphenol free
Polymethylmethacrylate (PMMA) (membrane) Bisphenol free	Ethylene vinyl alcohol copolymer (EVAL) (membrane) Bisphenol free	AN69 consisting of Acrylonitrile and Sodium methallylsulfonate (membrane) Bisphenol free
Polyflux is a mix of Polyarylethersulfone, Polyvinylpyrrolidone, Polyamide (membrane) BPS		
POLYAMIDE	POLYARYLETHERSULFONE	PVP

Tabla 3. Tipos de dializadores usados en hemodiálisis y composición de la membrana y la carcasa.
* Membranas sintéticas son tratadas con PVP para hacerlas más hidrofílicas.

Externamente el dializador tiene una cubierta o carcasa de material plástico resistente, en cuyo interior del cual están los capilares de las membranas y el líquido de diálisis. La composición más usual del mismo es de policarbonato aunque podemos encontrar también polipropileno, poliuretano o triacetato de celulosa.

- Líquido de diálisis

En la hemodiálisis se pone en contacto la sangre del paciente con un líquido de diálisis, de composición variable y que se equilibrará con la sangre. El líquido de diálisis o baño de diálisis resulta de la unión de agua ultrapura, bicarbonato y un concentrado de electrolitos denominado concentrado de diálisis. Esta unión lo realiza en las concentraciones exactas el monitor de diálisis. Luego es trasladado al dializador para ponerse en contacto con la sangre a través de la membrana de diálisis.

El líquido de reposición sirve para reponer todo o la mayor parte del líquido perdido por el ultrafiltrado, que es el fluido que se elimina con las moléculas que lleva disueltas. Es muy adecuado utilizar una misma solución para dializar y reponer, ya que ello simplifica el tratamiento. La composición de estos fluidos, son muy cercanas a la del plasma.

- Líneas arterial y venosa

El circuito extracorpóreo se conecta al paciente mediante la línea arterial, y mediante un bomba, la sangre se impulsa hacia el dializador (300 ml/min). Se produce el paso de la sangre por los capilares del dializador, donde se realiza el intercambio de sustancias. La sangre depurada sale del dializador y regresa al paciente por la línea venosa. En el trayecto de ambas líneas existen lugares para realizar extracción de sangre o administración de medicación, al igual que cámaras para la estabilización de la sangre. Ambas líneas están fabricadas en PVC (policloruro de vinilo) que contiene BPA al igual que los adaptadores de dichas líneas.

- Agujas

La sangre es extraída del acceso vascular del paciente gracias a la utilización de unas agujas de 14-16 french de diámetro, que tienen igualmente un trayecto plástico, contiene también BPA y que sirve de unión a las líneas.

El recorrido de la sangre desde que sale del acceso vascular del paciente pasa primero por las agujas de punción o el catéter, las líneas arteriales, los capilares del dializador, donde se ponen en contacto con el líquido de diálisis, la línea venosa y la aguja de entrada. Durante ese tiempo está en contacto con diversos materiales plásticos con diferente grado de biocompatibilidad.

- ***Principios físicos en la hemodiálisis.***

El dializador está dividido en dos espacios por medio de una membrana semipermeable: por un lado pasa la sangre y por el otro el líquido de diálisis. Esta membrana es muy delgada y contiene poros que permiten el paso de las sustancias de desecho o tóxicas y del agua desde la sangre hacia el líquido de diálisis no permitiendo el paso de elementos formes, proteínas de tamaño grande, hormonas, etc...

En la diálisis, la sangre del paciente presenta concentraciones de sustancias tóxicas (incluyendo desechos metabólicos) y el líquido de diálisis no las contiene, por lo tanto, esta diferencia de concentración de un lado al otro es lo que determina el pase de sustancias desde la sangre al dializado. Todo este proceso es dinámico ya que la sangre circula constantemente por el filtro: del dializador sale sangre sin impurezas que retorna al paciente por el acceso venoso y entra sangre con toxinas por el acceso arterial a la membrana de diálisis, al igual que, sale dializado con toxinas y entra dializado sin ellas, existiendo siempre la diferencia de concentración necesaria para poder eliminar

esas toxinas de la sangre en forma continua. Por otra parte, también se necesita extraer el agua que se ha acumulado en el cuerpo ya que esta sobrecarga de líquido provoca presión alta y un aumento en el trabajo del corazón con el riesgo que esto implica. La manera de realizarlo es generar mecánicamente un aumento en la presión del compartimento de la sangre dentro del filtro que empuja al líquido contra la membrana forzándolo a atravesarla hacia el compartimiento del dializado por donde es eliminado.

Los tres principios físicos que rigen la diálisis son:

- **DIFUSION:** es el proceso por el cual dos soluciones de diferentes concentraciones, cuando se pone en contacto, llegan a formar una mezcla uniforme, a causa del movimiento constante de las partículas de las dos soluciones, que tienden a distribuirse uniformemente por todo el volumen de la solución.
- **OSMOSIS:** consiste en el desplazamiento del líquido a través de una membrana semipermeable desde el lado de menor concentración al de mayor concentración. Este fenómeno se utiliza en la diálisis peritoneal.
- **CONVECCION:** es el paso de agua y solutos producido por una diferencia de presiones a los dos lados de la membrana. De esta forma se favorece el paso del agua y las moléculas que le acompañan en una u otra dirección.
- ***Tipos de técnicas en hemodiálisis.***

En función de estas características se describen las siguientes modalidades de hemodiálisis:

- a) **HEMODIÁLISIS DE BAJO FLUJO (HD convencional).**

La más utilizada hasta hace 10 años. En ella se utiliza un dializador de baja permeabilidad hidráulica y el tamaño de los poros es pequeño (antiguamente de

cuprofano, aunque actualmente se utilizan otras celulosas modificadas o membranas sintéticas). Se utiliza como tampón el bicarbonato. La depuración se realiza mediante mecanismo difusivo. No depura las grandes moléculas y lo hace de manera insuficiente con las medianas. Podemos diferenciar entre *baja eficacia* (dializadores de baja eficiencia, $KoA < 600$ ml/min, $Kuf < 12$ ml/h/mm Hg, flujo de sangre entre 200 y 300 ml/min y flujo de líquido de diálisis de 500 ml/min) y *alta eficacia* (dializadores de alta eficiencia, $KoA > 600$ ml/min, $Kuf 10-20$ ml/h/mm Hg, flujos de sangre entre 300-500 ml/min y flujo del líquido de diálisis entre 500-800 ml/min. Este tipo de diálisis pretendía inicialmente reducir el tiempo de diálisis mejorando el rendimiento de los procesos de difusión, con lo que se mantenía una dosis de diálisis adecuada. Posteriormente el objetivo ya no fue reducir el tiempo, sino poder ofertar una mayor dosis global de diálisis.

b) HEMODIÁLISIS DE ALTO FLUJO:

Esta técnica pretende mejorar la calidad de diálisis y el tamaño de los poros es mayor. Se utilizan membranas de alta permeabilidad. Mejora el aclaramiento de moléculas de peso molecular mediano. El transporte sigue siendo difusivo, si bien existe más transporte convectivo que en las modalidades anteriores. Se necesita de un líquido de diálisis estéril ya que casi siempre se producirá cierto grado de retrofiltración⁴⁶

c) HEMODIAFILTRACIÓN:

Son las modalidades más recientes y utilizan, además del transporte difusivo, el convectivo. Precisa membranas de alta permeabilidad, eficiencia y flujo, monitores complejos con estricto control de la ultrafiltración y elevada pureza del líquido de diálisis. Se emplea una tasa de ultrafiltración elevada (3-30 litros/sesión), siendo necesario reponer la mayoría del volumen ultrafiltrado con un líquido de sustitución de forma sincronizada que debe tener una adecuada composición electrolítica, estéril y sin

pirógenos. La reposición puede hacerse antes (pre-dilucional) o después (post-dilucional) de la entrada de la sangre en el dializador. Es una técnica que depura de forma muy eficiente las pequeñas y medianas moléculas, sin que exista retrofiltración.

Hay muchas variedades de hemodiafiltración en las que se debe diferenciar entre técnicas con volumen de reinfusión bajo (inferior a 15 litros) y técnicas de hemodiafiltración con elevados volúmenes de reinfusión (superior a 15 litros).

a) HDF con un volumen de reinfusión inferior a 15 litros:

- Biofiltración o Hemodiafiltración convencional. La reposición se realiza con un volumen inferior a 2 litros/hora.

- Biofiltración sin acetato (AFB). El líquido de diálisis no tiene solución tampón, la ultrafiltración es pequeña, de unos 2-3 litros a la hora y la reposición se hace con una solución de bicarbonato. Con esta técnica se consigue un gran control del equilibrio ácido-base, ya que puede individualizarse el aporte de bicarbonato.

- Diálisis con regeneración del ultrafiltrado (HFR): Se utiliza como líquido de reinfusión el propio ultrafiltrado del paciente tras pasar por un cartucho adsorbente.

b) HDF con un volumen de reinfusión superior a 15 litros:

- Hemodiafiltración en línea (“on-line”). Es la técnica más reciente y se caracteriza por que el propio monitor de diálisis genera el líquido de sustitución de forma continua a partir del líquido de diálisis. cartucho adsorbente. Evita el almacenamiento del líquido de reposición, si bien necesita que el líquido de diálisis tenga unas características de pureza determinada (líquido ultrapuro). Alto volumen de reposición, entre 5-10 litros/hora, generalmente más de 20 litros por sesión.

- Hemofiltración. No hay líquido de diálisis, por lo que no hay difusión, sólo transporte convectivo. Precisa de grandes volúmenes de ultrafiltrado que se reponen con líquido de sustitución (más de 20 litros por sesión). Precisa de membranas de alta permeabilidad.

No depura de forma adecuada las pequeñas moléculas, por lo que es una técnica en desuso para la enfermedad renal crónica, al menos en nuestro país, si bien se sigue empleando en las unidades de cuidados intensivos, como técnica continua y lenta debido a su buena tolerancia hemodinámica.

E. Toxinas Urémicas.

Se definen como sustancias que se acumulan en los pacientes urémicos y que son responsables de los cambios clínicos. Su eliminación previene un síntoma o daño y por lo tanto una respuesta inflamatoria. Se conocen más de 5000, aunque no todas están bien estudiadas. Pueden estar unidas o no a proteínas.

Hay una clasificación clásica de toxinas urémicas:

- Pequeñas e hidrosolubles, cuyo tamaño son < 500 Da son fácilmente eliminadas por cualquier técnica de diálisis como son la urea o creatinina, y se caracterizan por que no tienen que ser necesariamente tóxicas

Urea	
Oxalato	
Ribonucleotidos	metiladenosina,pseudouridina
Guanidinas	guanidina, ADMA
Polioles	arabinitol,sorbitol,manitol
Péptidos	lipotropina
Purinas	urico, xantina
Primidinas	ac. orotico,timina

Tabla 4. Toxinas urémicas de pequeño tamaño.

- Medianas, aquellas cuyo tamaño comprendido está entre $500 - 5000$ Da, son complicadas de eliminar, no valen todas las técnicas de diálisis y podemos encontrar entre ellas a la leptina y a la $\beta 2$ -microglobulina.

Peptidos	beta 2 microglobulina, PTH, leptina
Citocinos	IL-1, IL-6, TNF
Adipocitocinas	Adiponectina, visfatina

Tabla 5. *Toxinas urémicas tamaño medio*

- Moléculas unidas a proteínas (cualquier peso molecular) , las más difíciles de eliminar. Podemos encontrar entre ellas fenoles o índoles.

Homocisteína	
Fenoles	fenol, p-cresol
AGE	glioxal
Hipuratos	ac. Hipurico
Índoles	Indoxil-sulfato
Peptidos	Leptina, RBP
Poliaminas	spermina, spermidina

Tabla 6. *Toxinas urémicas unidos a proteínas.*

La mayoría de ellas en pacientes renales están aumentadas con respecto a personas con función renal normal. En representación de toxinas endógenas se encuentran el p-cresol o los índoles, como productos del metabolismo de las bacterias de la flora intestinal han sido ampliamente estudiadas y presentan analogías con el BPA que es el objeto principal de esta tesis.

- ***Importancia clínica***

El síndrome urémico constituye una compleja asociación de anomalías bioquímicas y fisiopatológicas, debido a la acumulación de un importante número de sustancias como resultado de la disminución de la filtración glomerular y de otros factores en relación con la disfunción renal. Un importante número de sustancias se acumula en la insuficiencia renal y la mayoría de ellas ejercen un efecto perjudicial sobre las múltiples funciones fisiológicas y bioquímicas de todos los sistemas orgánicos, por lo cual el síndrome urémico resulta así de la acumulación global de varias sustancias y no de una sola sustancia. En este sentido se considera que los principales productos de la retención en la uremia son: la urea, la creatinina, la pseudo-uridina ⁴⁷, la metilguanidina y otras

guanidinas, el sulfato de indoxilo, el ácido orto-hipúrico^{48,49}, ciertos péptidos⁵⁰, la hormona paratiroidea, la beta 2 microglobulina, las poliaminas⁵¹, las purinas, los fenoles e índoles, los fosfatos, los ácidos uránicos⁵², la dimetilarginina⁵³, los oxalatos⁵⁴ y la homocisteína. Por ello es importante depurarlas del organismo cuando el riñón no pueda hacerlo.

- ***Depuración.***

La diálisis debe depurar lo más parecido al riñón con un punto de corte de 60000 Da (Albumina). La HD de bajo flujo elimina moléculas cuyo tamaño es < de 5000 Da. Las moléculas pequeñas como la urea o la creatinina, dependen de difusión (se dializan bien con cualquier membrana o técnica). Las moléculas más grandes se dializan bien con transporte convectivo o por ultrafiltración y mejor cuanto mayor es el poro del dializador: HF80 < PEPA ; arilane < FX1000 (Tipos de dializador).

Las técnicas de hemodiafiltración con altos volúmenes de reposición, son las más eficaces en la eliminación de las toxinas urémicas tanto de pequeñas, medianas como grandes moléculas. Todavía no disponemos de técnicas eficaces para la adecuada eliminación de las toxinas de pequeño tamaño unidas a proteínas.

Las toxinas intracelulares necesitan del tiempo para mejorar su depuración, pues deben de pasar desde la célula hasta el plasma. Muchas de estas moléculas no son depuradas correctamente, pues en las horas que dura la diálisis, estas no pasan de forma rápida al plasma, y ocurre en las horas siguientes a finalizar la diálisis.

2. BISFENOL A

- *Historia y Aplicación industrial.*

El bisfenol A, es un compuesto orgánico con dos grupos funcionales fenólicos. Es un monómero habitual que forma parte de muchos plásticos y aditivos plásticos de uso diario. Fue sintetizado por primera vez por el químico ruso Aleksandr Dianin en 1891

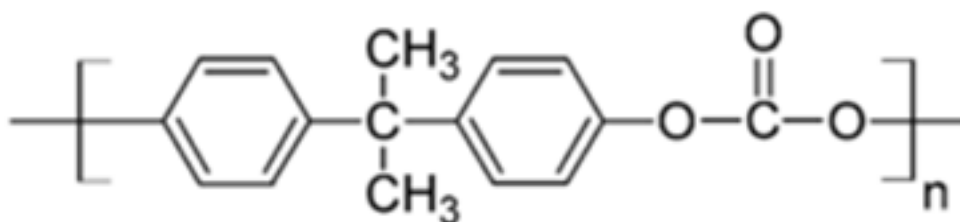


Figura 6.- Estructura química unitaria de policarbonato hecho de Bisfenol A. Peso Molecular del monómero: 284 g/mol.

Su síntesis se realiza mediante la condensación de la acetona con dos equivalentes de fenol. La reacción es catalizada por un ácido, como el ácido clorhídrico (HCl), o una resina de poliestireno sulfonado.

La importancia del BPA deriva de su ubicuidad, pues se trata de un compuesto que está presente en la mayoría de los envases usados comúnmente; es un componente habitual en plásticos (policarbonatos) y resinas epoxi. Fue utilizado inicialmente en la década de 1930 como estrógeno sintético^{55,56}, siendo sustituido por el dietilestilbestrol (DES)⁵⁷. Acabo convirtiéndose en un monómero en la fabricación de diversos productos cotidianos como son botellas de plástico, biberones o lentillas. Las resinas epoxi que contienen BPA se usan como recubrimiento de latas usadas en alimentación, aunque existe una tendencia a su sustitución por poliésteres⁵⁸. Ante lo extendido de su uso, el riesgo potencial del BPA, como estrógeno sintético de consumo cotidiano, en la salud humana lleva muchos años siendo un tema de debate para las agencias reguladoras.

- **Metabolismo**

El BPA ha despertado el interés entre la comunidad nefrológica pues se le ha relacionado con alteraciones renales y endocrinas, pero sobre todo porque su eliminación es renal, y por lo tanto el paciente renal tiene incrementados sus niveles sanguíneos y tisulares. Puede considerarse una toxina urémica de origen exógeno.

El BPA suele ser pasar al torrente circulatorio a través de la vía oral, usualmente acompañando a los productos contenidos en recipientes de plástico que lo contienen. Al igual que ocurre con los fenoles de origen intestinal, el BPA se conjuga en intestino e hígado con ácido glucurónico y se elimina en su práctica totalidad en la orina ⁵⁹ (Figura 7).

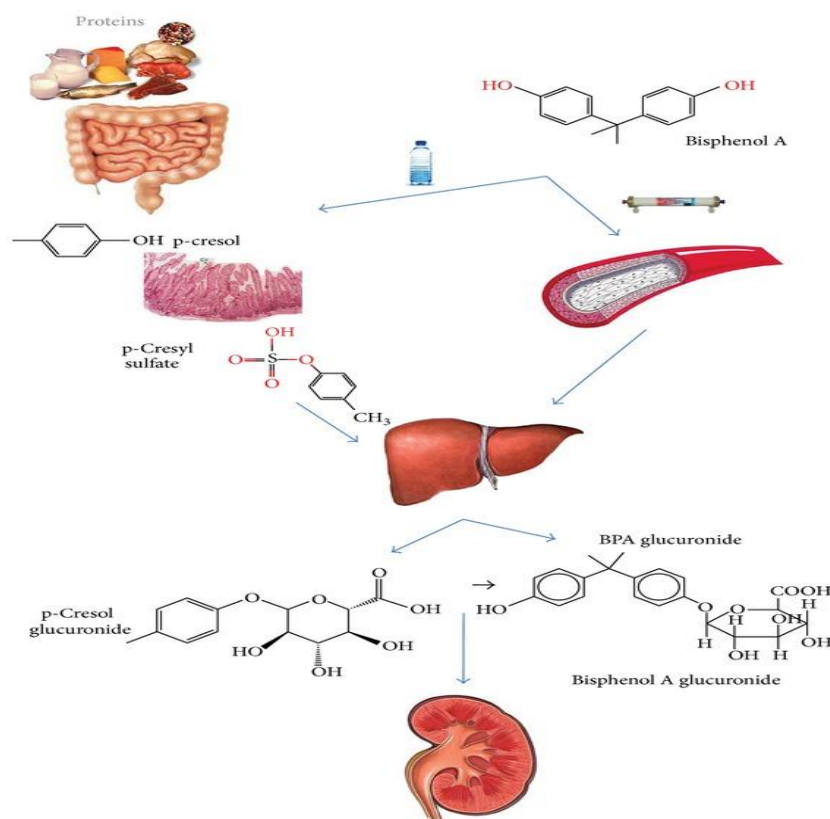


Figura 7. Metabolismo del bisfenol A y su excreción por el riñón. ⁶⁰

También puede existir exposición por vía no oral de manera que es considerado un tóxico de origen ambiental. Sin embargo, más controvertida es su exposición constante durante años dada su función como agonista endocrino. El BPA está catalogado comúnmente como disruptor endocrino. A pesar de las evidencias publicadas ⁶¹, las autoridades europeas y americanas consideran que debido a su rápida eliminación, se puede considerar al BPA un compuesto relativamente seguro.

- ***Efectos a nivel celular.***

Hay muchos estudios que evidencian que el BPA es perjudicial para los humanos y no solo genera activación por parte de las células de procesos inflamatorios o respuesta a estrés oxidativo ^{62,63} si no que está involucrado en la formación de tumores por sobreexpresión de la ciclooxigenasa - 2 (COX - 2) y la transición epitelio-mesenquimal (EMT) por efecto del BPA ^{64,65}. El BPA disminuye la actividad enzimática de los complejos (I,II,III,IV y V) de la cadena de transporte electrónico, un aumento significativo en peroxidación lipídica, proteínas de oxidación y generación de superóxidos mitocondriales ⁶⁶. Hay estudios en ratas que sugiere disfunción de las células β pancreáticas por exposición de BPA y muerte celular por apoptosis vía citocromo C ⁶⁷. De hecho, varios estudios publicados confirman que las células beta pancreáticas son una diana del BPA. Por ejemplo, las señales de Ca^{2+} inducida por glucosa se potenciaron, y el factor de transcripción CREB se activó en islotes recién aislados tratados con una dosis baja de BPA ^{68,69}. En la actualidad, muchas evidencias revelan que BPA podrían interaccionar con muchos receptores hormonales nucleares tales como los receptores de estrógenos ^{70,71}, receptor estrógeno humano ^{70,72,73}, receptor de esteroides y xenobióticos ⁷⁴, receptor de andrógenos ^{72,75}, receptor humano proliferador de peroxisomas ⁷⁶ y el receptor de tiroideas ^{77,78}. BPA inicia respuestas rápidas a través

receptores unidos a membrana de estrógenos con aproximadamente la misma potencia como el 17βestradiol(E2) ^{79,80}, pero la afinidad a los receptores nucleares clásicos ERα y ERβ es mucho menor que la de la hormona endógena. También podría verse afectado el sistema tiroideo ⁸¹. El BPA podría tener efectos sobre el cerebro humano en desarrollo que resultan de la interacción con el receptor de andrógenos ⁸², o que se deben a la interferencia con los efectos de los estrógenos sobre el circuito neural o plasticidad que no están relacionados con la diferenciación sexual ⁸³.

- ***Evidencias en modelos animales***

Existen evidencias directas de la toxicidad sobre animales de experimentación del BPA:

- a) Aparato reproductor: En ratas expuestas a altas dosis de BPA existe un incremento de espermatozoides inmaduros ⁸⁴. Los efectos de la exposición al BPA neonatal en ratones fue diferente según el nivel de BPA, a 2 mg / kg aumenta el peso de la próstata adulta ⁸⁵ y con 10 mg / kg interrumpe el desarrollo de la próstata ⁸⁶. La exposición a 10 mg / kg en ratas aumenta la susceptibilidad de la glándula prostática a la edad adulta a la carcinogénesis hormonal ⁸⁷. Las ratas macho expuestas a BPA tienen menores recuentos de espermatozoides y de niveles de testosterona con un efecto significativo en la fertilidad ⁸⁸.
- b) Efectos neurológicos: Un estudio sobre los embriones de pez cebra en desarrollo mostraron que el BPA puede influir en el desarrollo del cerebro incluyendo el hipotálamo, telencéfalo, y las áreas pre-ópticas ⁸⁹. Estudios en roedores demostraron que la exposición en el útero o perinatal a BPA puede dar lugar a interrupciones permanentes en el comportamiento, incluyendo aumento de los niveles de agresión y la ansiedad, y alteraciones en el aprendizaje, la memoria, la

exploración y la capacidad de respuesta emocional ⁹⁰. Varios estudios con ratones concluyeron que la exposición a dosis bajas de BPA materno tiene consecuencias a largo plazo en el nivel de desarrollo neuro-conductual ⁹¹, y también la exposición neonatal a BPA puede afectar a la morfología del cerebro presentan dimorfismo sexual y los fenotipos neuronales adultas ⁹².

- c) Obesidad: de la exposición al BPA tiene efectos persistentes sobre el peso corporal y la adiposidad ⁹³. Un estudio que se ha realizado en ratas, se ha sugerido que la exposición perinatal al agua potable que contenía 1 mg / L de BPA aumentó la adipogénesis en las hembras al momento del destete ⁹⁴.

- ***Evidencias en humanos***

Muchos de los hallazgos observados en animales de experimentación se han confirmado en estudios clínicos.

- a) Aparato reproductor y alteraciones endocrinas: Se ha visto que incluso concentraciones muy bajas de BPA son capaces de producir alteraciones tanto en la espermatogénesis ⁹⁵; como estrogénicas ⁹⁶ daño pancreático ⁹⁷, alteraciones tiroideas ⁹⁸ o inducir daño hepático ⁹⁹.
- b) Tumorigénesis: La exposición a BPA se ha asociado a la aparición de neuroblastomas y tumores de mama ¹⁰⁰.
- c) Efectos neurológicos: asociada con el aumento de la hiperactividad y la agresión en niños ¹⁰¹.
- d) Obesidad y diabetes: la exposición BPA se ha relacionado con el desarrollo de la obesidad ¹⁰², resistencia a la insulina y diabetes ^{89,103,104}, describiéndose que es capaz de inhibir la liberación de adiponectina ¹⁰⁵.

- e) Enfermedad cardiovascular: En los últimos años se han publicado numerosos estudios que relacionan esta molécula con diferentes alteraciones en el aparato cardiovascular, observándose tanto su implicación en arritmias, mediante unión a canales del calcio ¹⁰⁶, como su asociación en riesgo cardiovascular. Así por cada aumento de 4,5 µg/l de BPA en orina el aumento de la incidencia de enfermedad coronaria se incrementó en un 13% a 10 años ¹⁰⁷.

El más probable de estos factores, sería su influencia sobre la tensión arterial, observándose que en adultos sanos estadounidenses los niveles de BPA en orina > 4 µg/L se asociaron con un aumento del 50% en la prevalencia de la hipertensión en comparación con los niveles de BPA en orina < 1,5 µg / L ¹⁰⁸.

• ***Legislación***

La legislación actual ante la falta de criterios científicos concluyentes recomiendan reducir la exposición todo lo más posible¹⁰⁹, fijando unos niveles máximos de seguridad de 5 mg/Kg/día en adultos. Aunque siguiendo un principio de precaución desde junio de 2011 se prohibió en toda la UE los biberones y tetinas que contuvieran BPA, al haberse observado un potencial daño muy superior en niños recién nacidos.

Los motivos para que no sean prohibido se basan en los siguientes criterios:

- Alto coste económico eliminarlo
- Las evidencias son en animales. No hay ensayos en humanos
- Diferencias entre metabolismo de animales de experimentación y humanos.
- La eliminación es renal prácticamente completa inmediatamente después de la ingesta.

Sin embargo, a favor de su eliminación se esgrimen una cantidad creciente de evidencias de la asociación de la exposición al bisfenol con el desarrollo de patologías tanto en modelos experimentales como en estudios observacionales en humanos.

3. BISFENOL A EN LA ENFERMEDAD RENAL.

Capítulo aparte merece la relación del BPA con la enfermedad renal, dado que en este caso no solo es un compuesto con un papel directo en la patología renal, sino que su vía de eliminación fundamental es la renal. Por lo tanto, al ser un compuesto de eliminación renal, el BPA se acumula en los pacientes con enfermedad renal.

- ***BPA como causa del daño renal.***

Entre los indicios que apunta a un papel causal en enfermedad renal está el hecho que en adultos sanos niveles de BPA urinario $> 1.4 \text{ mg / L}$ se asocia con un 23% mayor de riesgo de microalbuminuria que en adultos con niveles $< 0,5 \text{ mg / L}$ ¹¹⁰, como en niños ¹¹¹. Asimismo, se ha relacionado con la existencia de albuminuria de bajo grado en adultos chinos ¹¹². Se han identificado posibles mecanismos de nefrotoxicidad mediada por BPA implicando un aumento del estrés oxidativo, la inflamación y la inducción de la hipertensión arterial ^{113,114}. También recientemente el BPA sérico ha demostrado ser un predictor de progresión de enfermedad renal en pacientes con diabetes tipo II ¹¹⁵, de manera que aquellos pacientes con niveles más altos tienen una mayor progresión de su enfermedad renal. Se ha demostrado que el BPA reduce la actividad antioxidante, lo cual debe contribuir al estrés oxidativo ⁶², también que el BPA reduce la viabilidad podocitaria ¹¹³ y es capaz de producir hipertrofia podocitaria involucrando a TFG- β y la ciclina kinasa inhibidor p27Kip1, el cual es conocido por su papel en el mecanismo de la hipertrofia de la célula renal ¹¹⁶⁻¹¹⁸.

Sin embargo, es el acúmulo de esta sustancia en el paciente con un descenso del filtrado glomerular, lo que ha motivado su análisis como posible toxina urémica. Unos de los argumentos para considerar seguro el uso del BPA en el consumo ordinario por los diferentes organismos oficiales, es la eliminación casi completa por orina de molécula conjugada ¹¹⁹. Por ese motivo la exposición del BPA en pacientes con daño renal, en los que su eliminación esta alterada, debe hacer considerar a estos pacientes una población especialmente sensible al BPA.

A mayor progresión de la enfermedad renal este bucle de retroalimentación aumentaría. De forma que los pacientes en hemodiálisis no son capaces de excretar en BPA en la orina ¹²⁰, correlacionando su acumulo con el deterioro de la función renal ¹²¹. Sin embargo el National Health and Nutrition Examination Survey 2003-6 (NHANES III), sobre una muestra de 2573 pacientes, observo también un descenso de eliminación de BPA con el deterioro de la función renal, aunque en este caso fue solo significativo en mujeres ¹¹⁰. Mientras que en el estudio de Krieter. ¹²² se observa una correlación entre el deterioro de la función renal y las concentraciones plasmáticas de BPA.

- ***BPA en diálisis.***

El paciente en diálisis es un paciente con especial riesgo en la toxicidad debida al BPA, al tener abolida completamente la eliminación renal, que es la vía de excreción habitual. Pero además en los pacientes en hemodiálisis se añade el que el BPA, al ser un componente ubicuo, forma parte de la composición del material plástico de algunos dializadores, y líneas de uso común tanto en forma de policarbonato en las carcasas, como en múltiples membranas de diálisis, como es el caso de la polisulfona (PS) o el “Polyester-Polymer alloy” (PEPA). (Figura 8).

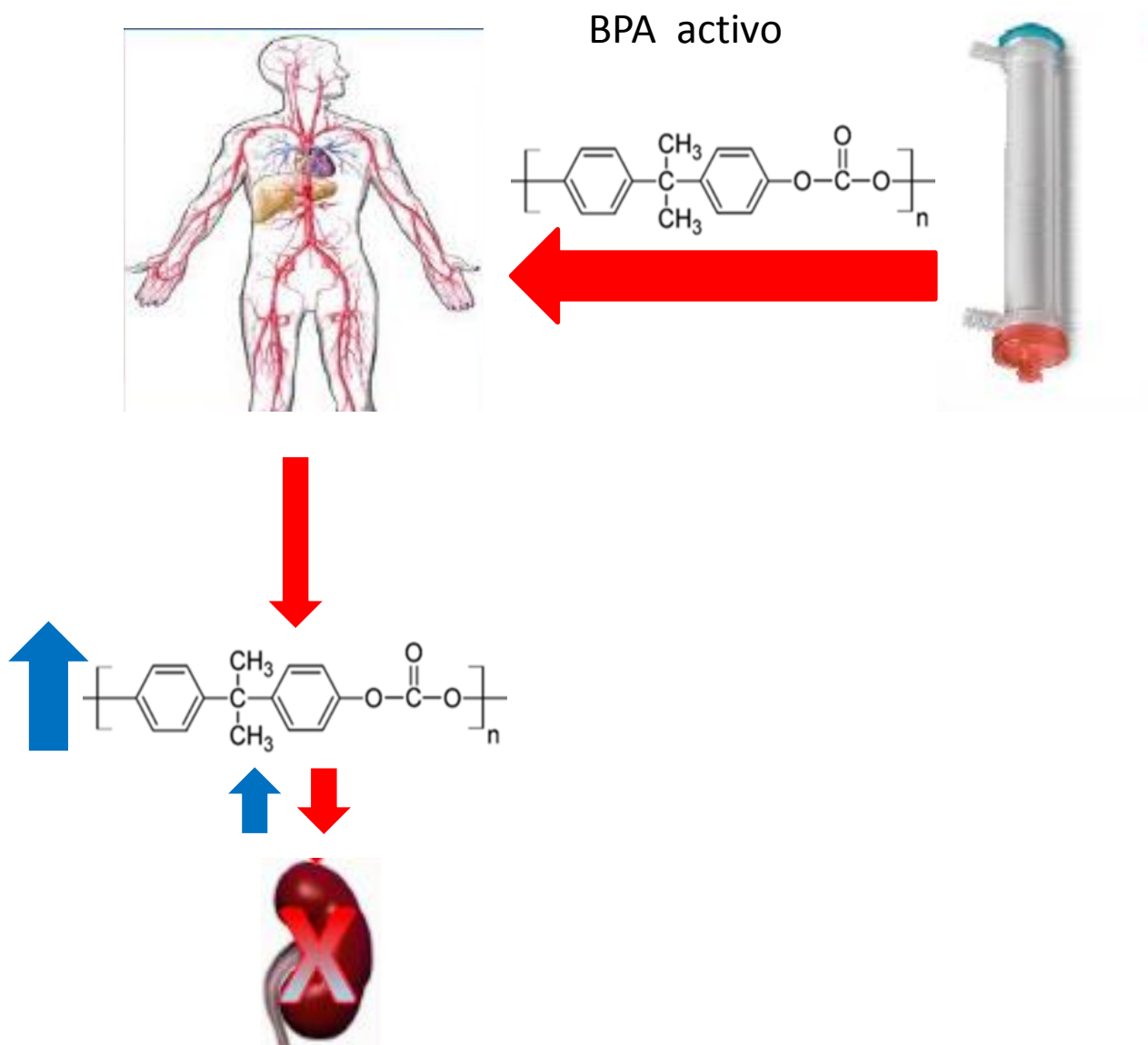


Figura 8. BPA en el paciente en hemodiálisis. BPA como componente de muchos dializadores.

En estos dializadores, el polímero se halla en constante contacto con la sangre lo que daría lugar a liberación del mismo al torrente circulatorio. Por lo que su incremento en el paciente en hemodiálisis no solo es debido a una exposición ambiental, sino posiblemente a la propia técnica ¹²³. Diferentes estudios han descrito que los efluentes

de los dializadores compuestos por esos materiales tienen concentraciones superiores de BPA ¹²¹.

H. Shintani et al. ¹²⁴ analizó cuatro tipos de dializadores de polisulfona del mercado, con carcasa de policarbonato o de copolímero de butadieno-poliestireno, y con esterilización con vapor de agua o rayos gamma. El BPA aumenta más en dializadores con carcasa de policarbonato, independientemente de la membrana. Los dializadores de polisulfona con carcasa de policarbonato esterilizados con vapor de agua son los que mayor nivel de BPA se detecta en el efluente. Conclusiones similares han sido encontrados por otros autores ¹²⁵.

Sus estudios muestran que la migración de BPA en los dializadores es muy superior cuando se usa sangre que cuando se hace con salino. Posiblemente esta diferencia se debe al efecto de componentes hidrofóbicos como lípidos, lipoproteínas, presentes en la sangre. Así, la concentración de BPA en el efluente de un líquido sobre una membrana de polisulfona es diferente si el flujo sobre esta es de agua o de suero bovino (eluyéndose 3.78-141.8 ng vs. 140.7-2090 mg por dializador)¹²³.

El flujo también afectaría a la cantidad de BPA extraída, debido al tiempo de residencia en el dializador. Por todo ello aunque resulta muy difícil determinar en estos pacientes si las concentraciones plasmáticas superan las recomendadas, la mayoría de autores recomiendan usar en los pacientes en diálisis, dializadores con un aporte inferior de BPA y además intentar evitar materiales plásticos ricos en BPA como botellas.

No existen estudios bien diseñados sobre la implicación de técnicas como la hemodiafiltración, con gran transporte convectivo. Si bien es una técnica que puede aclarar el BPA, no es menos cierto que se usa un líquido de reinfusión que atraviesa membranas con BPA, por lo que podría estar incrementada su infusión. Habrá que

determinar su implicación en estudios prospectivos y cruzados, para observar que ocurre en esta modalidad de tratamiento.

Por el contrario, en DP tan solo existe un estudio acerca de impacto del BPA encontrándose que su concentración el líquido de diálisis es muy inferior al permitido. Aunque solo lo estudian en 4 pacientes, solo parece aumentar en uno. Por lo que los autores concluyen que el BPA no parece depurarse ni incrementar con la DP ¹²⁶.

Las recientes evidencias lleva a que el “Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks” emita a principios de 2015 un informe titulado: “Final opinion on The safety of the use of bisphenol A in medical devices” en el que concluyen que existe un riesgo de efectos adversos derivados del BPA cuando esta disponibles por vía sistémica mediante rutas de exposición no oral, especialmente para neonatos en unidades de cuidados intensivos, niños sometidos a procedimientos médicos prolongados o pacientes en diálisis³⁹.

A pesar de toda esta certidumbre, no existen prácticamente estudios prospectivos a largo plazo que relacionen el efecto de la hemodiálisis con la presencia de BPA y sus posibles efectos. En 2013, Krieter et al ¹²² estudiaron el efecto de la hemodiálisis en un periodo de 4 semanas. Concluyendo que las diferencias entre las membranas con bisfenol (polisulfona) y sin bisfenol (polinefrona) no eran significativas, sin embargo, el hecho de que las carcassas de todos los dializadores empleados contuvieran BPA y el corto tiempo de estudio podría explicar estos resultados.

III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPOTESIS

La hipótesis de trabajo es la ubicua exposición al bisfenol A es dañino para el organismo dadas sus características de disruptor endocrino. Sin embargo, esta toxicidad se ve atenuada en condiciones fisiológicas normales por su rápida conjugación y excreción.

De forma que cualquier alteración en la conjugación o la excreción da lugar a una mayor toxicidad. Estas alteraciones se encuentran en el paciente renal, donde existe una severa disminución de la excreción con el agravante que el proceso de diálisis puede suponer un riesgo adicional al ser una fuente de bisfenol directamente por vía parenteral retrasando su conjugación hepática.

OBJETIVOS

El objetivo general del presente trabajo fue evaluar en una población de pacientes con enfermedad renal crónica estadio 5D, en tratamiento con hemodiálisis periódica, los niveles de bisfenol A (BPA) en sangre comparando dos dializadores, con y sin bisfenol A en su composición.

Este objetivo general se realizó a través de la realización de los siguientes objetivos parciales.

- Analizar las características poblacionales de los grupos de pacientes con ERC estadio 5D seleccionadas para su inclusión en los tratamientos dialíticos.
- Evaluar el acumulo de BPA en estos pacientes en plasma tras hemodiálisis periódica.

- Cuantificar si el BPA es capaz de introducirse en el interior de la célula.
- Estudiar la respuesta inflamatoria y generación de estrés oxidativo por acumulo de BPA en plasma de enfermos con ERC estadio 5D.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Técnica de diálisis.

En este estudio se ha analizado la influencia que tiene el BPA presente en los dializadores usados en los pacientes con Insuficiencia renal en tratamiento renal sustitutivo con la técnica de hemodiálisis. Para ello hemos elegido una técnica de diálisis en la cual el transporte difusivo sea el único que intervenga desechando las técnicas con transporte convectivo en las cuales entran otra serie de factores de difícil comparación. Por ese motivo los pacientes estudiados estaban dializados con hemodiálisis convencional, y ninguno con ninguna técnica de hemodiafiltración. Con esa diálisis se pretende, al tratarse del primer estudio realizado con un diseño similar, determinar qué importancia tiene la membrana de diálisis en la transferencia de BPA presente en las membranas de diálisis al paciente.

Para evitar un posible factor de la función renal los pacientes estudiados no tenían una diuresis superior a 500 ml/día. Igualmente, se les orientó dietéticamente para que supieran que productos contenían BPA sin modificar sus costumbres alimenticias.

Este estudio fue aprobado por el Comité de Ensayos Clínicos de la Fundación Jiménez Díaz, aunque en ningún momento se modificaba la práctica clínica habitual, y no es intervencionista, las buenas Prácticas Clínicas obliga a un visto bueno por el Comité. Los pacientes firmaron un consentimiento en participar en el estudio, previa información por parte del médico responsable.

Con estas premisas la población estudiada fue realizada en dos hospitales simultáneamente. En la Unidad de Hemodiálisis de la Fundación Jiménez Díaz y en la Unidad de Hemodiálisis del Hospital General de Burgos.

Pasamos a comentar los diferentes componentes implicados en la sesión de hemodiálisis: Dializadores, Monitores y Líneas

2. Dializadores.

Para este estudio clínico se ha usado dos tipos de dializadores, uno con BPA en su membrana y otro sin él. El primero de ellos fue el FXClassix-80 (Fresenius, Bad Homburg, Alemania) y el segundo el ELISEO 17-H (Nipro Corp, Osaka, Japón). El dializador FX80 con una membrana de helixone (polisulfona), formado por un polímero que contiene Bisfenol A (BPA) en su composición, mientras que el dializador ELISEO-17H, cuya membrana está fabricada en polinefrona (polietersulfona) sin BPA en su composición. Las especificaciones técnicas de cada dializador se detallan en la Tabla 7. En ambos dializadores, el material de la carcasa está hecho por polipropileno, que es un material libre de BPA.



Membrana de diálisis ELISIO 17H



Membrana de diálisis Fx 80

Figura 9. Membranas de diálisis ELISIO 17H Y Fx80.

ACLARAMIENTO (Qf:0, QD:500 y QB:300) ml/min									
Dializador	Superficie m ²	Urea	Creatinina	Vitamina B12	Inulina	Mioglobina	Fosfatos	Vol.de b ml/hr*mmHg	Coef.. UC ml/mm Hg/hr
<u>Fx80</u>	<u>1,8</u>	<u>198</u>	<u>193</u>	<u>55</u>	<u>103</u>	<u>0,1</u>	<u>187</u>	<u>95</u>	<u>53</u>
<u>E17H</u>	<u>1,9</u>	<u>280</u>	<u>268</u>	<u>95</u>	<u>127</u>	<u>101</u>	<u>215</u>	<u>115</u>	<u>76</u>

Tabla 7. Especificaciones técnicas de los dializadores empleados en los pacientes en hemodiálisis

3. Líneas de sangre y monitores de diálisis.

Las líneas de sangre empleadas en todos los casos fueron hechas de policloruro de vinilo (PVC) (FreseniusMedical Care) que no contiene BPA en su composición, pero este si se encontraría en las sujeciones rígidas que unen los diferentes segmentos. Aunque en este caso apenas se hayan en contacto directo con la sangre, siendo su posible contribución mínima.

Los monitores de diálisis empleadas fueron la 4008S y la 5008 S (Fresenius). Ambos monitores presentan retrofiltros para evitar el paso de endotoxinas compuestos de polisulfona, por lo que cabría la posibilidad de que el líquido de diálisis tuviera BPA, pero al ser un transporte difusivo casi completamente, si despreciamos la retrofiltración, y ser común a todos los pacientes, no se ha tenido en cuenta. La duración de la hemodiálisis ha sido siempre superior a 3.5 horas, y no se ha tenido en cuenta el flujo de la sangre, aunque siempre ha sido superior a 300 ml/min. Igualmente los pacientes podrían dializarse por cualquier tipo de acceso vascular. Se desecharon catéteres transitorios.



Líneas de sangre usadas en la diálisis



Monitor Diálisis 5008S Fresenius

Figura 10. Líneas de sangre y monitor de diálisis usados en el estudio.

4. Estudio en pacientes.

- ***Población de estudio***

Se trata de un estudio cruzado que compara el dializador con membrana de polisulfona y dializador con membrana de polinefrona en 69 pacientes prevalentes en hemodiálisis. El estudio se aprobó por el Comité de Ética IIS-Fundación Jiménez Díaz. Los pacientes eran reclutados después de dar su consentimiento informado por escrito. Los criterios de inclusión y exclusión fueron los siguientes: edad > 18 años; tiempo en hemodiálisis > 3 meses; diuresis > 0,5 L / 24 h; consentimiento informado; y ausencia de enfermedades inflamatorias, infecciosas u oncológicas activas en la iniciación o durante el estudio. El muestreo de línea de base y los datos fueron recogidos en el consentimiento.

Los controles seleccionados tenían edad y sexo similar a la muestra estudiada y todos con función renal normal. Se decidió usar controles sanos y no pacientes con ERC ya que estos no son capaces de excretar el BPA por la orina y se les acumula en sangre y

no representa la situación basal. Si se hubiera elegido pacientes con ERC dependiendo del FG que tuviera cada paciente, tendría una influencia sobre niveles séricos de BPA.

- ***Diseño estudio prospectivo***

Para comparar el efecto de ambas membranas, se seleccionaron aquellos pacientes dializados de forma habitual con cualquiera de las dos. Aquellos pacientes que eran dializados de forma rutinaria con un FX80 fueron dializados inicialmente 3 meses con un dializador ELISEO 17-H, y lo contrario. Así, antes del estudio 41 pacientes estaban siendo dializados con una membrana de polinefrona y con polisulfona en 28 pacientes, por lo que los primeros 3 meses lo fueron con polisulfona y polinefrona respectivamente. A los 3 meses se cambió el dializador de manera que durante otros tres meses fueron dializados con el dializador contrario.

Las muestras analizadas en el estudio fueron todas en sangre. Todas ellas se sacaron antes del comienzo de la sesión de la diálisis para evitar la posible influencia del paso por la membrana. Se realizó la extracción al comienzo del estudio o basal (A), después de 3 meses (B) y después del último periodo de 3 meses (C), que correspondía con el final del estudio (C) (Figura 11).

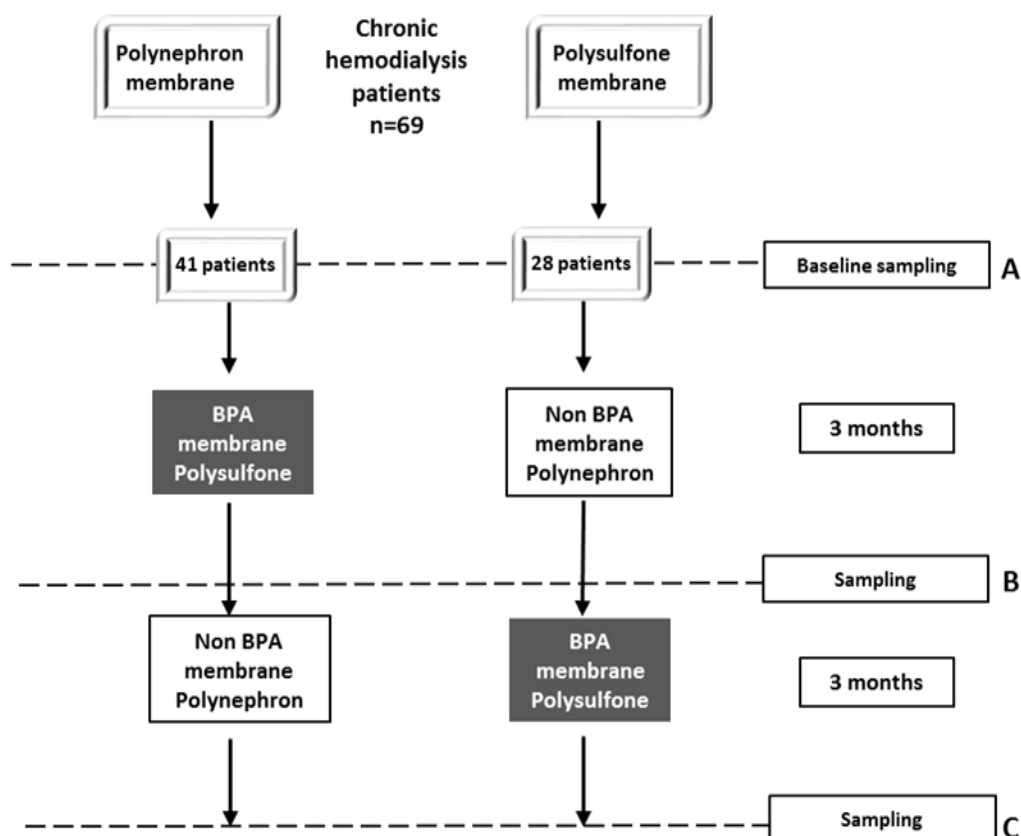


Figura 11. Diseño del estudio. En este estudio cruzado, los pacientes de hemodiálisis prevalentes fueron evaluados y se tomaron muestras al inicio del estudio y cambiaron a una membrana de diálisis diferente durante 3 meses. En ese momento se tomaron muestras y la membrana cambiaron a la línea de base. A los 6 meses la nueva toma de muestras se llevó a cabo.

A un grupo de 10 pacientes con ERC se tomaron muestras de sangre antes (prediálisis) y después (postdiálisis) en una única sesión de diálisis para determinar los cambios de BPA en una sesión usando tanto membranas de polinefrona (ELISIO) y como membranas de diálisis de polisulfona (FX80). Los 10 pacientes fueron los mismos de manera que en el primer periodo se dializaron con una membrana y el siguiente con otra.

Los datos recogidos fueron: características demográficas básicas (edad, sexo), datos derivados de la diálisis (años en hemodiálisis, KTV, causa de su ERC), datos clínicos (Presión arterial, accidentes vasculares), bioquímicos y terapéuticos (Dosis de EPO, antiagregantes, estatinas) (Tabla 8) (ver apartado Parámetros Bioquímicos).

En otros 5 pacientes se realizó una extracción de sangre a la entrada (Inflow) y salida (Outflow) de cada uno de los dializadores en una única sesión de diálisis, al inicio y al final de la sesión para determinar los cambios de BPA.

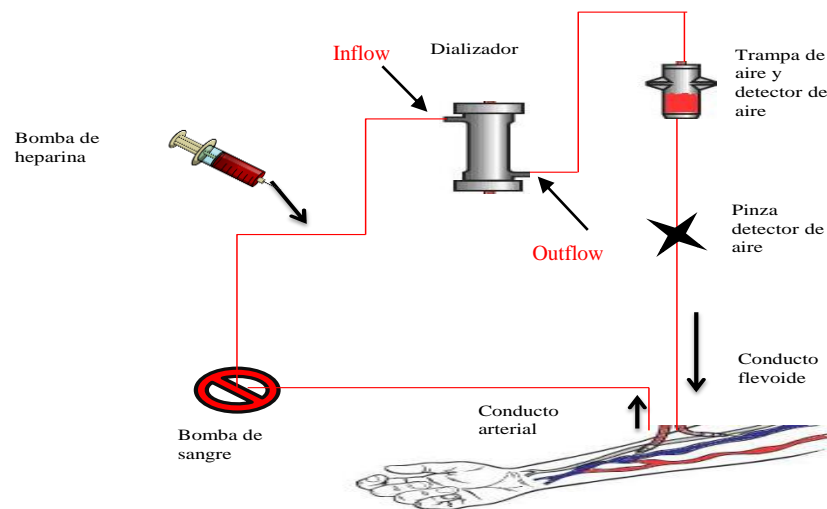


Figura 12. Extracción muestras de sangre de pacientes en hemodiálisis, Inflow y Outflow en el dializador.

También se diseñó un estudio piloto ($n = 7$) en pacientes recién ingresados en hemodiálisis (Incidentes), los cuales se midió los niveles de BPA en suero al inicio del estudio y después de tres semanas de diálisis con una membrana de polisulfona. Al final de este periodo se les cambio la membrana a una polinefrona y estuvieron otras tres semanas. Se les recogió suero al inicio y al final de este periodo igualmente. Los parámetros clínicos y bioquímicos de estos pacientes se recogen en la Tabla 9 (ver apartado parámetros bioquímicos).

- ***Obtención de muestras biológicas.***

Las muestras de sangre provienen de pacientes en hemodiálisis y fueron extraídas por el personal de enfermería antes del inicio y al final del proceso de diálisis, según

correspondiera. Estas muestras provienen de la Fundación Jiménez Díaz y del Hospital Universitario de Burgos (HUB). Para el grupo control se obtuvieron donantes en el Banco de Sangre hospitalario de la Fundación Jiménez Díaz, Madrid, España. En todos los casos se informó al paciente, se realizó un tratamiento confidencial de los datos clínicos y se obtuvo la autorización previa a la realización del trabajo. Todos los estudios cumplen la normativa de la Declaración de Helsinki y fueron aprobados por los comités éticos correspondientes a cada institución. Se extrajo la sangre en tubos con EDTA estériles, tanto para la obtención del plasma como de las células mononucleares (PBMCs), tras la obtención del consentimiento informado.

Una vez recogida la sangre en el tubo se invierte entre 8-10 veces el tubo inmediatamente ya que ayuda a prevenir la formación de fibrina que puede afectar a los análisis posteriores. Se mantiene los tubos a 4°C después de la recolección y durante el procesamiento. Se centrifuga los tubos de sangre dentro de las 2 horas siguientes a la extracción. Para separar el plasma se centrifuga entre 1.100 – 1.300 g durante 10 minutos a 4°C. Se evita mezclar o agitar la muestra después de centrifugarla para evitar la resuspensión del pellet celular. Se cogió el plasma que corresponde a la parte superior del tubo centrifugado, evitando acercarse a la capa de gel/celular. El plasma obtenido se alicuota y almacena a -80°C (almacenamiento a largo plazo). Alternativamente se puede almacenar a -20°C o 4°C durante las 24-48 horas siguientes a la extracción sanguínea (almacenamiento a corto plazo).

Para extraer las células mononucleares (PBMCs) se aislaron por centrifugación de densidad de Lympho Separation Medium (MP Biomedicals, Ilikrich, Francia). Se transfirió 10 ml de sangre a un tubo de 50 ml, se diluye un ½ con solución salina para después hacer el Ficoll. Se añade 3 partes de sangre por 1 de Ficoll. Se centrifuga a 2000 rpm, 30 minutos a temperatura ambiente (aprox 25°C) quitando freno y el

acelerador de la centrifuga. Tras la centrifugación se recoge el halo blanco de la PBMCs (figura 5) y se pone en un falcon de 15 mL y se enrasa hasta arriba de solución salina para lavar las células, se centrifuga a 1800 rpm, 9 minutos a TA sin freno y el acelerador.

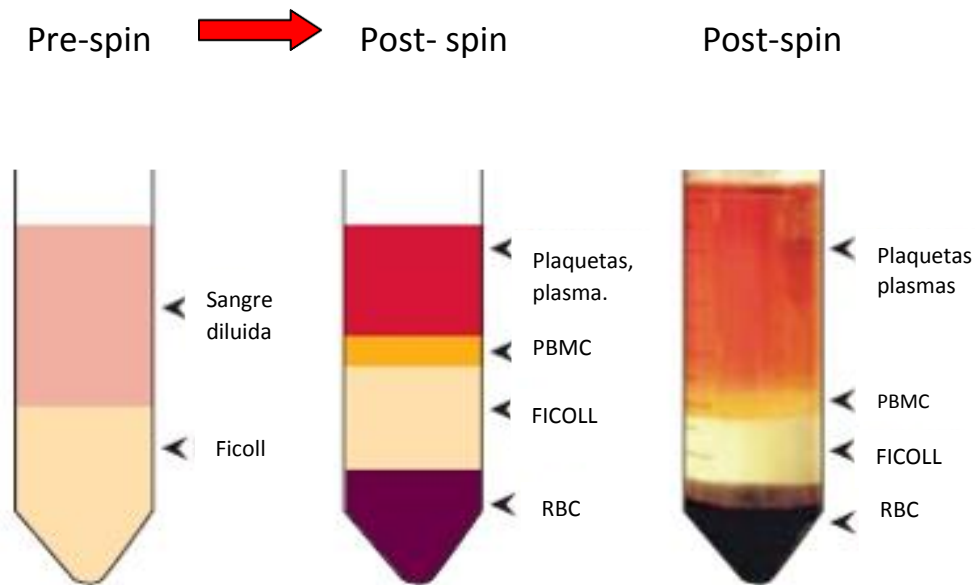


Figura 13. Separación PBMCs por gradiente de densidad Ficoll.

5. Parámetros bioquímicos.

Para todos los pacientes se midieron los siguientes parámetros bioquímicos en los laboratorios de análisis clínicos de la Fundación Jiménez Díaz y del Hospital universitario de Burgos (ADVIA 2400 chemistry system, SIEMENS Healthcare, Alemania) (Tablas 8 y 9)

	N	Mean	Standard deviation
Edad	69	65	13
Tiempo en dialisis(meses)	69	63	92
Kt/Vurea	68	1.54	0.38
Leucocitos (1000/ μ L)	69	5.6	1.6
Hemoglobina (g/dl)	69	11.5	1.3
25 OH vitamin D (ng/mL)	64	16	10
Proteinas totales (g/dl)	69	6.6	0.5
Albumina (g/dl)	69	3.76	0.59
Ca (mg/dl)	69	9.1	0.5
P (mg/dl)	69	4.8	1.5
Colesterol (mg/dl)	69	154	36
Trigliceridos (mg/dl)	69	127	75
Proteina C reactiva (mg/dl)	69	8.6	14.2
PTH (pg/ml)*	69	235	123-414
EPO dose (U/semana)	62/69 (90%)	5199	7724
Quelantes de Calcio (mg/dia)	20/69 (29%)	1329	859
Sevelamer (mg/dia)	33/69 (48%)	4388	2601
Lantano (mg/dia)	23/69 (33%)	2641	764
Quelantes de Magnesio (mg/dia)	8/69 (12%)	822	397

P: Fosforo

* Se muestra mediana y rango intercuartil.

Ca: Calcio

EPO: Eritropoyetina

PTH: Paratohormona

Tabla 8. *Parámetros bioquímicos basales de los pacientes en hemodiálisis estudiados*

	N	Media	Desviación estándar
Edad	7	60	17
Kt/Vurea	7	1.48	0.34
Leucocitos (1000/ μ L)	7	7.9	3.8
Hemoglobina (g/dl)	7	9.8	1.6
25 OH vitamina D (ng/mL)	7	8.0	5.2
Proteinas totales (g/dl)	7	6.3	0.4
Albumina (g/dl)	7	3.4	0.35
Ca (mg/dl)	7	8.4	1.0
P (mg/dl)	7	4.6	1.1
Colesterol (mg/dl)	7	143	23
Trigliceridos (mg/dl)	7	124	56
Proteina C reactiva (mg/dl)	7	14.5	18.9
PTH (pg/ml)*	7	378	257-712
EPO dose (U/semana)	7/7 (100%)	8831	3371
Quelantes de Ca (mg/dia)	3/7 (42.85%)	3666	2081
Sevelamer (mg/dia)	2/7 (28.57%)	3600	1697
Lantano (mg/dia)	0/7 (0%)	-	-
Quelantes de Magnesio (mg/dia)	0/7 (0%)	-	-

P: Fosforo.

* Se muestra mediana y rango intercuartil

Ca: Calcio.

EPO: Eritropoyetina. .

Tabla 9. *Parámetros bioquímicos del grupo de pacientes en hemodiálisis incidentes estudiados.*

6. Cultivos celulares.

Para los experimentos *in vitro* empleamos tanto cultivo primario de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) como la línea celular HK2 de células epiteliales de túbulo proximal humanas (tabla 10). Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) se obtuvieron a partir de voluntarios sanos (Banco de Sangre hospitalario, Fundación Jiménez Díaz).. Las células se lavaron, se contaron y se ajustaron a $2-4 \times 10^6$ células / ml en medio de cultivo RPMI 1640 suplementado con FBS al 1% que contienen $100 \text{ U} \cdot \text{ml}^{-1}$ de la penicilina $100 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ de estreptomycin o Hanks' solución salina equilibrada (HBSS) a 37°C y 5 % CO_2 .

Las PBMCs fueron estimuladas con BPA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) a diferentes concentraciones comprendidas entre 0 y 137 ng/mL y también se co-incubaron con fibras de membranas de cada uno de los dializadores empleados en el estudio (Fx80, Fresenius, Bad Homburg, Alemania y Elisio, Nipro Corp, Osaka, Japón) a diferentes concentraciones en peso (mg) durante un tiempo de 24 horas para todos los experimentos.

Células	Fuente	Medios y condiciones de cultivo	Suplementos
Epiteliales de túbulo proximal humana HK2	Colección americana de cultivos tipo (ATCC) CRL-2190	RPMI 1640 (Sigma), Suero bovino fetal (Sigma) 10%, 37°C , 5 % CO_2 .	Glutamina 1% (Sigma) Penicilina 100U/mL (Sigma) Estreptomicina 100µg/mL (Sigma) ITS

Tabla 10 : Línea celular utilizada en los experimentos *in vitro*, origen y condiciones

7. Inmunofluorescencia con MitoSOX.

MitoSOX Red es un fluorocromo diseñado por Molecular Probes que permite la determinación de los niveles de superóxido mitocondriales. El reactivo MitoSOX Red es permeable en células vivas y se dirige rápida y selectivamente a las mitocondrias, donde es oxidado por el ion superóxido, emitiendo fluorescencia roja. Con el fin de determinar los niveles de superóxido mitocondrial por microscopía de fluorescencia, las células fueron cultivadas en placas con fondo de cristal (SPL Life Sciences Co., Ltd.). Después del tratamiento, el reactivo MitoSOX se disolvió en DMSO (sulfóxido de dimetilo), se diluyó hasta 5 μ M en medio libre de suero, y después se añadió a las células seguido de incubación durante 10 min a 37 ° C; las células se lavaron dos veces con PBS. Posteriormente, las células se fijaron con PFA 4 % y se volvieron a lavar con PBS tres veces. Los núcleos se contrastaron con DAPI y finalmente los cubreobjetos, con las células adheridas, se montaron con Mowiol 40-88 sobre portaobjetos de cristal para su posterior análisis por microscopía confocal (Laica).

8. Potencial de membrana mitocondrial.

Los cambios en el potencial de membrana (PMb) se determinaron utilizando un reactivo fluorescente selectivo por protones como las diferencias en éster metílico de tetrametilrodamina (TMRM) de fluorescencia (Molecular Probes, Life Technologies). Las células adherentes se combinaron con células desprendidas de forma espontánea y se tiñeron con 150 nM TMRM durante 10 min a 37°C. La disminución de la fluorescencia TMRM indica que PMb se reduce. La intensidad de fluorescencia se midió por citometría de flujo utilizando BD FACS Diva Software (BD Biosciences).

9. Caracterización células apoptóticas.

Para la evaluación de la apoptosis por citometría de flujo, las células adherentes se combinaron con las células desprendidas de forma espontánea y se incubaron en 100 g / ml yoduro de propidio, 0,05% NP-40, y 10 mg / ml de ARNasa A en PBS a 4 ° C de 24 h. Este ensayo permeabiliza las células, y el yoduro de propidio por lo tanto se introduce tanto en células vivas y como en las muertas. El porcentaje de células apoptóticas con disminución de tinción de DNA (células hipodiploides) se contaron por citometría de flujo utilizando BD FACS Diva Software (BD Biosciences).

10. Análisis proteico.

Los extractos de proteínas nucleares y citoplasmática (30 µg/mL) se obtuvieron a partir de células mononucleares de sangre periférica (volumen de sangre = 10 mL /paciente). Las fracciones citosólicas y el extracto nuclear (usado para western blot) fueron separadas y aisladas usando diferente buffer de lisis siguiendo las instrucciones del fabricante (NE-PER, Pierce). Para el análisis de Bisfenol A intracelular (mediante ELISA), las PBMC fueron resuspendidas en 100 µL buffer de lisis que contiene (Tris-HCl 50 mM; NaCl 150 mM; EDTA 2 mM; EGTA 2 mM; Triton 0.2%; NaF 0.2%; NP-40 and PMSF 0.1 mM). Todos los reactivos utilizados en ese buffer se adquirieron en SIGMA. Posteriormente se determinó la concentración de proteínas nucleares y citoplasmáticas mediante el método del ácido bicinónico (BCA de Pierce), y las muestras fueron almacenadas a -80 ° C.

11. Cuantificación mediante ELISA .

Para evaluar los niveles de producción de determinadas citoquinas y de BPA en plasma se utilizaron ensayos de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA). Se utilizaron un volumen de 100 μ L para cada muestra para determinar los niveles de IL-6, TNF α (PeproTech, EEUU) y de BPA (Abnova, Taiwan) en plasma. Para realizar una recta patrón y poder calcular los niveles exactos de ambas citoquinas y de BPA, se utilizaron una curva patrón con proteínas recombinantes.

12. Técnica Western Bot.

Las proteínas extraídas fueron separadas en geles de SDS-poliacrilamida (8-12 %) en condiciones reductoras. Una vez separadas en el gel, las proteínas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa (Bio-Rad). Las membranas se bloquearon durante una hora, para evitar uniones inespecíficas, utilizando leche desnatada en polvo (5 % en TBS), y posteriormente se incubaron con el anticuerpo primario correspondiente (diluido en la solución de bloqueo; (Tabla 11) a 4 °C durante la noche y en rotación constante. Al día siguiente, se lavaron tres veces en TBS con Tween-20 (TBST) al 0,1 % en ciclos de 10 min. Por último, las membranas fueron incubadas durante 1 hora con el anticuerpo secundario correspondiente (Amersham) y lavadas 3 veces con TBST en ciclos de 10 min. Las bandas de proteínas se detectaron por quimioluminiscencia usando el kit ECL (GE Healthcare) y revelando las membranas con el sistema ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare). Posteriormente, las imágenes obtenidas se analizaron con el programa Quantity One (Bio-Rad)

	Dilución anticuerpo primario	Dilucion anticuerpo secundario	Casa comercial
Nfe2l2 (Nrf 2)	1:500	Anti-conejo peroxidasa 1:2500	Santa Cruz Biotechnology
HO-1	1:1000	Anti-conejo peroxidasa 1:2500	ENZO
Prx-1	1:200	Anti-conejo peroxidasa 1:2500	Santa Cruz Biotechnology
GAPDH	1:5000	Anti-ratón peroxidasa 1:2500	EDM Millipore
HIS-3	1:1000	Anti-conejo peroxidasa 1:2500	EDM Millipore

Tabla 11. Anticuerpos y concentraciones utilizadas para detectar niveles de proteína por *western blot*.

13. Análisis expresión génica.

La obtención del ARN total de las PBMC's se llevó a cabo mediante recogida de las células, centrifugación (1500 rpm, 5 minutos) y eliminar el sobrenadante del eppendorf con mucho cuidado y añadimos Trizol (Invitrogen), siguiendo las indicaciones de la casa comercial. El ARN obtenido se cuantificó y se utilizó para obtener ADNc, empleando para ello un Kit de alta capacidad de síntesis de ADNc (Applied Biosystems). Los niveles de ADNc de los genes a estudio fueron determinados utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real mediante el sistema de detección de secuencias *Real-Time FAST PCR 7500* (Life Technologies). Se realizó un estudio multiplex empleando sondas de hibridación para cada gen a estudiar y, como control para normalizar los datos, se utilizó una sonda para el gen del ribosoma

18s eucariota (Tabla 12). El número de ciclos y las temperaturas utilizadas fueron las siguientes: un primer paso con 1 ciclo de 2 min a 50 °C, un segundo paso con un ciclo de 10 min a 95 °C y un tercer paso, con 40 ciclos, formado por una etapa de 15 segundos a 95 °C seguida de otra etapa de 60 segundos a 60 °C, siendo en esta última etapa de cada ciclo en la que se recogieron las medidas. Todas las sondas fueron adquiridas en Applied Biosystems. Todas las medidas fueron realizadas por duplicado, utilizando H2Odd como control negativo.

El número de copias de ARNm se calculó usando el programa incluido en el instrumental a partir del valor Ct. Los resultados se normalizaron con sus correspondientes valores de 18s.

La detección de la expresión de Catalasa y de Súperoxido dismutasa-1 (MnSOD) se realizó con Sybr Green y se normalizaron analizando la expresión de ARN 18s ribosómico utilizando los cebadores que se indican en la tabla 5. Los pasos fueron los siguientes: 1 ciclo de 5 minutos a 50 °C, 1 ciclo de 95 °C de 10 minutos, 40 ciclos de 94°C durante 1 minuto, 60°C durante 40 segundos y 72°C durante 60 segundos, por ultimo un ciclo de disociación de 95°C y 60°C durante 1 minuto. Las mediciones se realizaron durante el paso de 72°C. El análisis de cada muestra se realizó por duplicado, el número de copias de ARNm se calculó usando el programa incluido en el instrumental a partir de Ct (ciclo umbral). Los resultados se normalizaron con sus correspondientes valores de 18s.

GEN	Fluoróforo / Especie	Numero Identificador
IL-6	FAM / humano	Hs00174131_m1
TNFα	FAM / humano	Hs00174128_m1
NFE2L2 (Nrf 2)	FAM / humano	Hs00975961_g1
HMOX-1 (HO-1)	FAM / humano	Hs01110250_m1
NQO-1	FAM / humano	Hs00168547_m1
18 S	VIC / eucariota	4310893E
SOD-1	SYBR GREEN/eucariota	Sentido: 5'- CACTCGTGGCTGTGGTGGCT -3' Antisentido: 5'- GCTGATGCCCGCCGATCTGCT -3'
CATALASA	SYBR GREEN/eucariota	Sentido: 5'-TTAATCCATTTCGATCTCACC-3' Antisentido: 5'-GGCGGTGAGTGTCAGGATAG-3'
18 S ARN	SYBR GREEN/eucariota	Sentido: 5'- CCGTCGTAGTTCCGACCATAA-3' Antisentido: 5'- CAGCTTTGCAACCATACTCCC-3'

Tabla 12. Listado de las sondas utilizadas para el análisis génico por PCR a tiempo Real.

14. Análisis estadístico.

Las variables fueron cuantificadas al inicio, a los 3 y a los 6 meses del estudio como media y SEM. Se calcularon los cambios desde el inicio hasta los 3 meses y entre los 3 meses a 6 meses para cada línea de dializador. Además, se analizaron los datos agrupados que abarcan ambos períodos utilizando el mismo dializador (los pacientes de 0-3 meses en un único dializador de una parte del estudio y el grupo de los 3-6 meses

con el mismo dializador. Del mismo modo también se analizaron el otro grupo de pacientes que usaron el otro dializador).

El análisis estadístico de todos los resultados se realizó utilizando el *software* estadístico R versión 3.15. Lo primero que se comprobó fue que las muestras fueran normales (prueba de Kolmogorov–Smirnov), y en los casos en los que este supuesto se cumplió, se realizó un análisis comparativo de las medias utilizando el test paramétrico T-Student. En los casos en los que las muestras no eran normales, se realizó la prueba no paramétrica Wilcoxon. En cualquiera de los casos las diferencias se consideraron significativas cuando $p < 0,05$.

v. RESULTADOS

1. Niveles de BPA en suero de pacientes en Hemodiálisis.

Al ser el BPA un compuesto de uso en gran cantidad de materiales plásticos, la exposición al mismo es ubicua, de forma que el 90 % de la población en EEUU tienen cantidades detectables en sus orinas¹²⁷. Por lo que se planteó, el estudio prospectivo del acumulo de BPA en pacientes en enfermedad renal terminal y por tanto necesitan de la diálisis para eliminar proteínas, urea y demás toxinas urémicas como productos de desecho metabólicos. Al comparar los niveles de BPA entre las dos poblaciones, sanos y enfermos, se observó que hay un aumento en la concentración de BPA en suero de 35 veces respecto del control (figura 14).

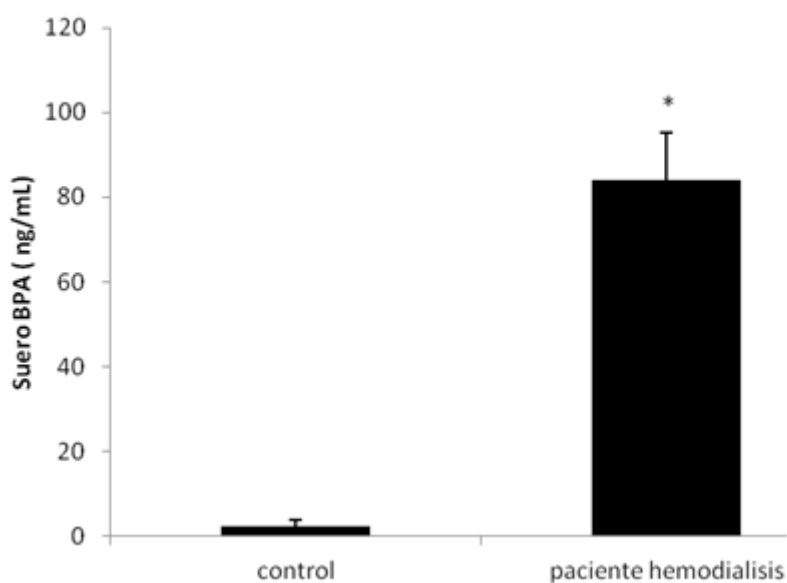


Figura 14. Concentracion de BPA en suero de controles sanos y de paciente en hemodialisis. * $P < 0.05$ vs Control.

2. Medida de niveles de BPA intracelular en controles sanos y en pacientes en Hemodialisis.

El BPA presenta características de antagonista hormonal pudiéndose unir a distintos receptores nucleares de hormonas. Así, el BPA imita al 17- β El estradiol (E2) y se clasifica como una alteración endocrina¹²⁸. Dado que no se ha cuantificado la internalización del BPA en estudios en humanos determinamos la concentración de BPA intracelular en células circulantes de pacientes en hemodiálisis y en controles sanos (Figura 15). Observan diferencias en las concentraciones de BPA en los grupos de estudio.

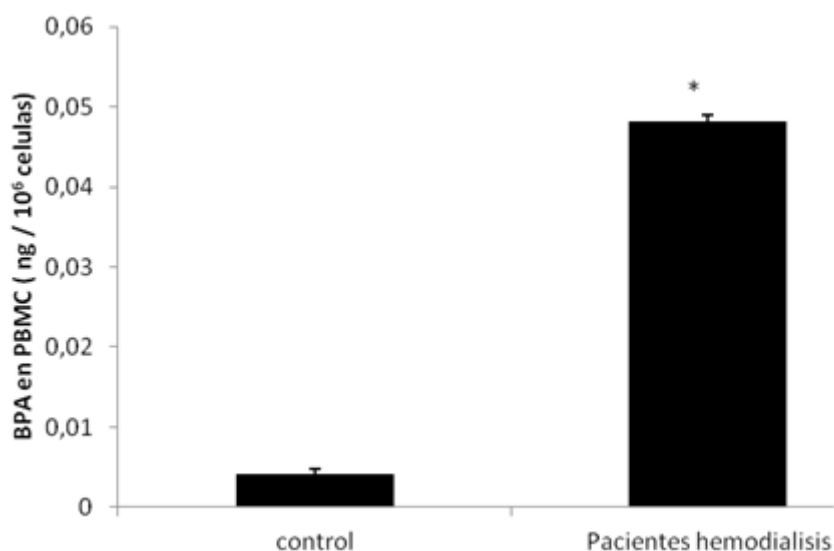


Figura 15. Concentración de BPA intracelular en PBMC de controles sanos y de pacientes en hemodialisis. * $P < 0.05$ vs control

3. Membranas de diálisis con polisulfona incrementan los niveles de BPA en una sola sesión de Hemodialisis.

En un diseño cruzado, los pacientes crónicos dializados con membrana de polisulfona (n = 28 en el momento de inicio) fueron cambiados a una diálisis con membranas de

polinefrona durante 3 meses siguientes. Posteriormente se cambio de nuevo otros 3 meses a la dialisis con membrana de polisulfona (figura 11) .

De igual manera, los pacientes cronicos dializados con membrana de polinefrona (n = 41 en el momento de inicio) fueron cambiados durante tres meses a una dialisis usando membranas de polisulfona, y como en el apartado anterior , se les cambi6 de nuevo durante otros tres meses con membranas de polinefrona (figura 11).

La determinaci6n del BPA se realiz6 despu6s de la 6ltima sesi6n de cada serie. Observ6ndose que despu6s de una sola sesi6n, usando dializadores de polisulfona la media de los niveles de BPA aument6 desde $46,46 \pm 8,5$ ng / mL a $78,46 \pm 11,0$ ng / mL (incremento de un 68 % sobre valores basales predialisis * $p < 0.05$) mientras que no se observaron cambios con los dializadores de polinefrona (figura 16).

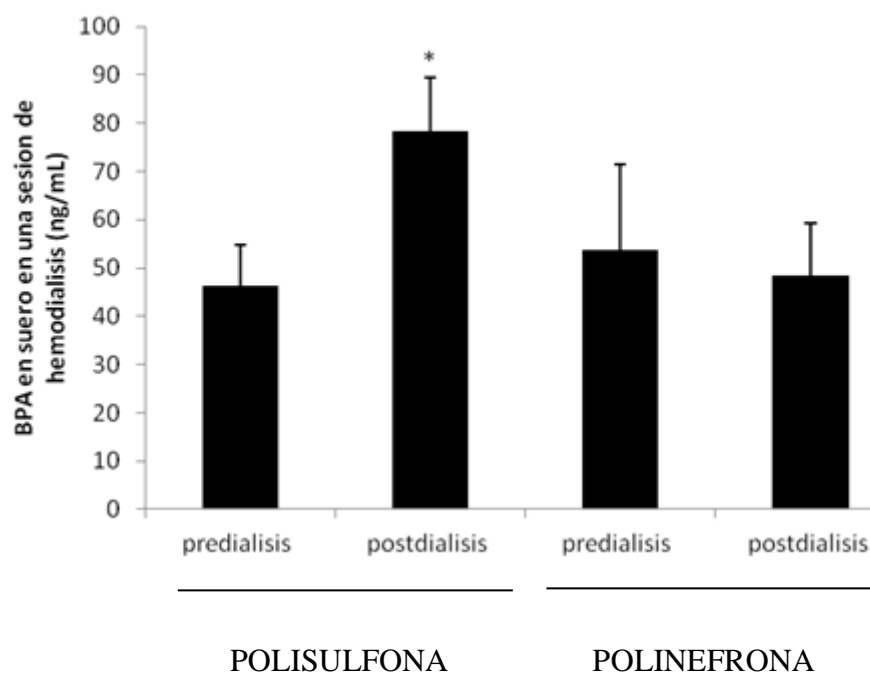


Figura 16. BPA en suero de pacientes dializados con membranas de polisulfona o polinefrona en una 6nica sesi6n. Est6 representada la media como \pm SEM de valores de postdialisis versus predialisis.

* $P < 0.002$ versus valores predialisis

4. Medida de niveles de BPA en suero a la entrada (INFLOW) y a la salida (OUTFLOW) de la membrana de diálisis en único pase.

Para evaluar la aportación de BPA por parte de la membrana de diálisis al suero de los pacientes sin tener en cuenta el factor de dilución de la misma, se tomaron muestras de sangre directamente de las líneas a la entrada (Inflow) y a la salida (Outflow) de ambos dializadores cuantificándose la concentración de BPA (figura 4). Al analizar los resultados se observó un ligero aumento de BPA en el flujo de salida que en el flujo de entrada del dializador con polisulfona pero no se observó ningún cambio o tendencia para las membranas con polinefrona (figura 17).

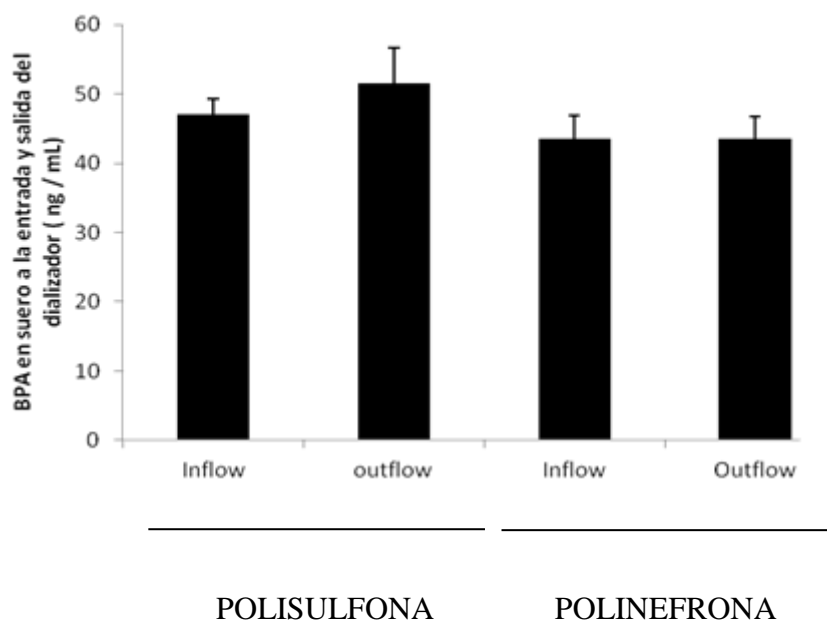


Figura 17. BPA en suero de pacientes en hemodiálisis en una única sesión a la entrada (INFLOW) y a la salida (OUTFLOW) de cada uno de los dializadores usados en el estudio.

5. El uso crónico de la membrana de diálisis influye en la concentración de BPA en el suero de pacientes en Hemodiálisis.

El uso continuo de una membrana de polisulfona durante 3 meses dio lugar a un aumento significativo de los niveles de BPA séricos en prediálisis (de 48.8 ± 6.8 a 69.1

± 10.1 ng / ml, un aumento del 44% para el combinado de 0-3 y 3-6 grupos POLISULFONA / mes, NS). Por otro lado, el uso crónico de membranas de polinefrona durante 3 meses reduce los niveles de BPA séricos en predialisis (de 70.6 ± 8.4 a 47.1 ± 7.5 ng /ml, una disminución del 33% para el combinado 0-3 y 3-6 grupos POLINEFRONA / mes, *P< 0,05; (Figura 18)

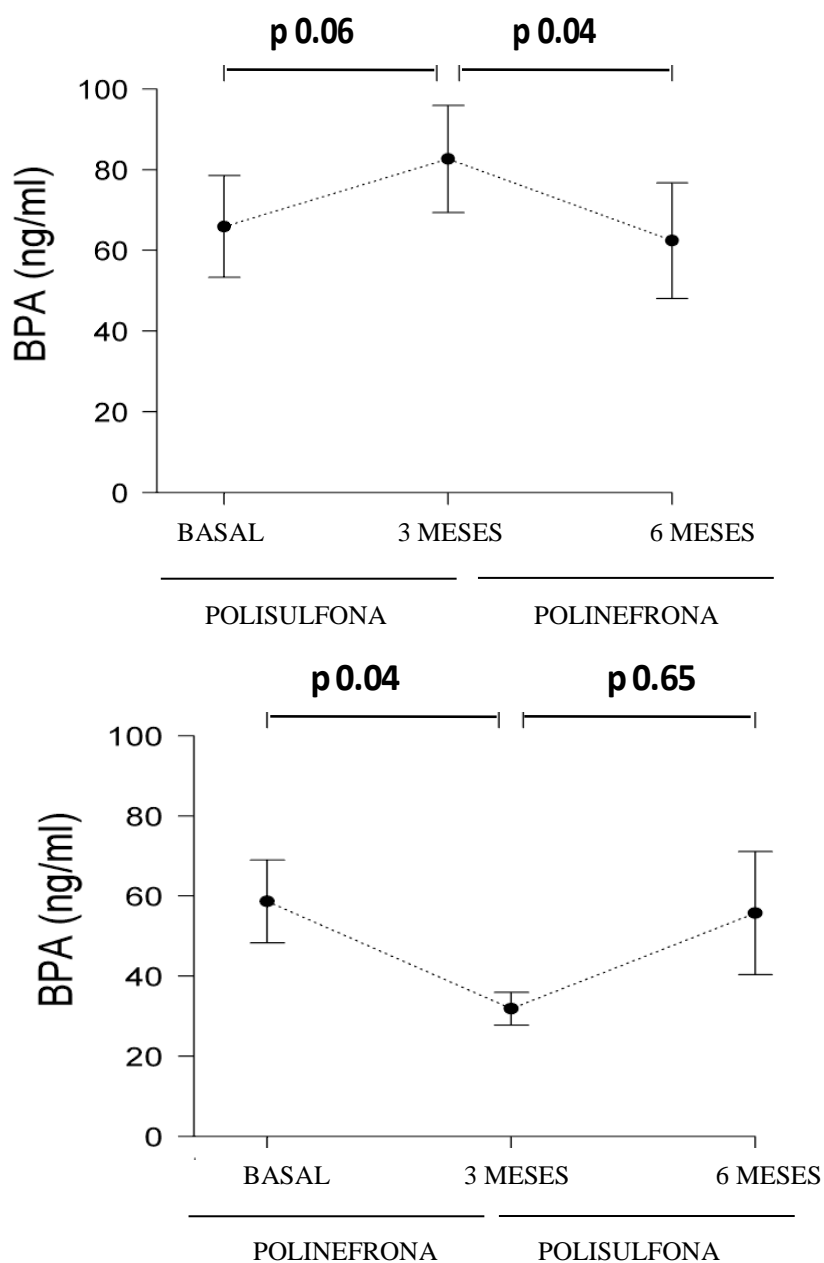


Figura 18. Media de BPA en suero de prediálisis en el tiempo de 6 meses

Un estudio con muchos menos pacientes (n= 7) de más corta duración (3 semanas para cada dializador) en pacientes recién ingresados (vírgenes) en hemodiálisis reveló una tendencia similar con un aumento de los niveles de BPA en suero con membranas de polisulfona pero ese incremento no fue significativo (Figura 19).

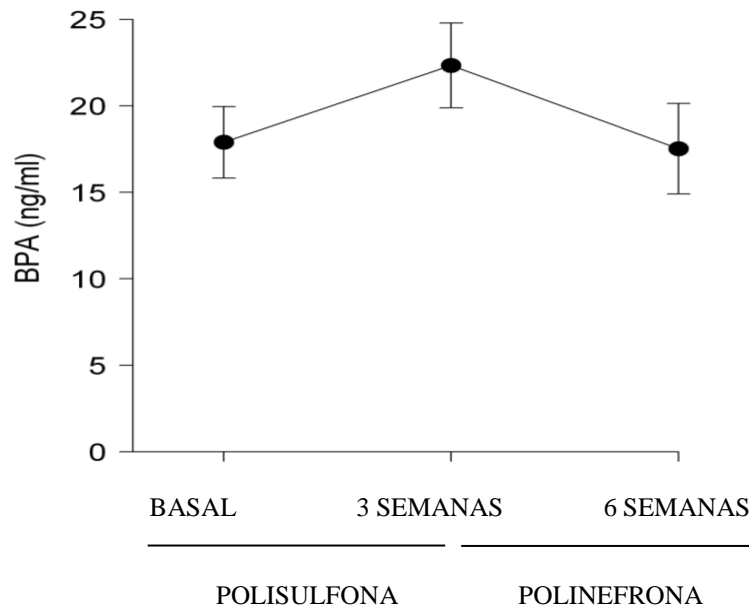


Figura 19. Concentraciones de BPA séricas en pacientes vírgenes. Pacientes vírgenes en hemodiálisis (n = 7) fueron evaluados al inicio del estudio y después de tres semanas de la diálisis con membranas de polisulfona y polinefrona respectivamente.

6. El uso crónico de membranas de polisulfona aumenta BPA intracelular mientras que el uso con membranas de polinefrona disminuye los niveles de BPA.

La hemodiálisis crónica con membranas de polisulfona durante 3 meses, aumentaron, en predialisis, los niveles de BPA intracelular en PBMC (de 0.039 ± 0.002 a 0.043 ± 0.001 células ng / 10^6 , un aumento del 10% para los combinados de los grupos 0-3 y 3-6 meses, *P< 0,01) mientras que la hemodiálisis con membranas de polinefrona disminuyeron los niveles de BPA intracelular (de 0.045 ± 0.001 a 0.036 ± 0.001 ng / 10^6

células, una disminución de 20% para el combinado de 0-3 y 3-6 meses /grupos, $P<0,01$; figura 20).

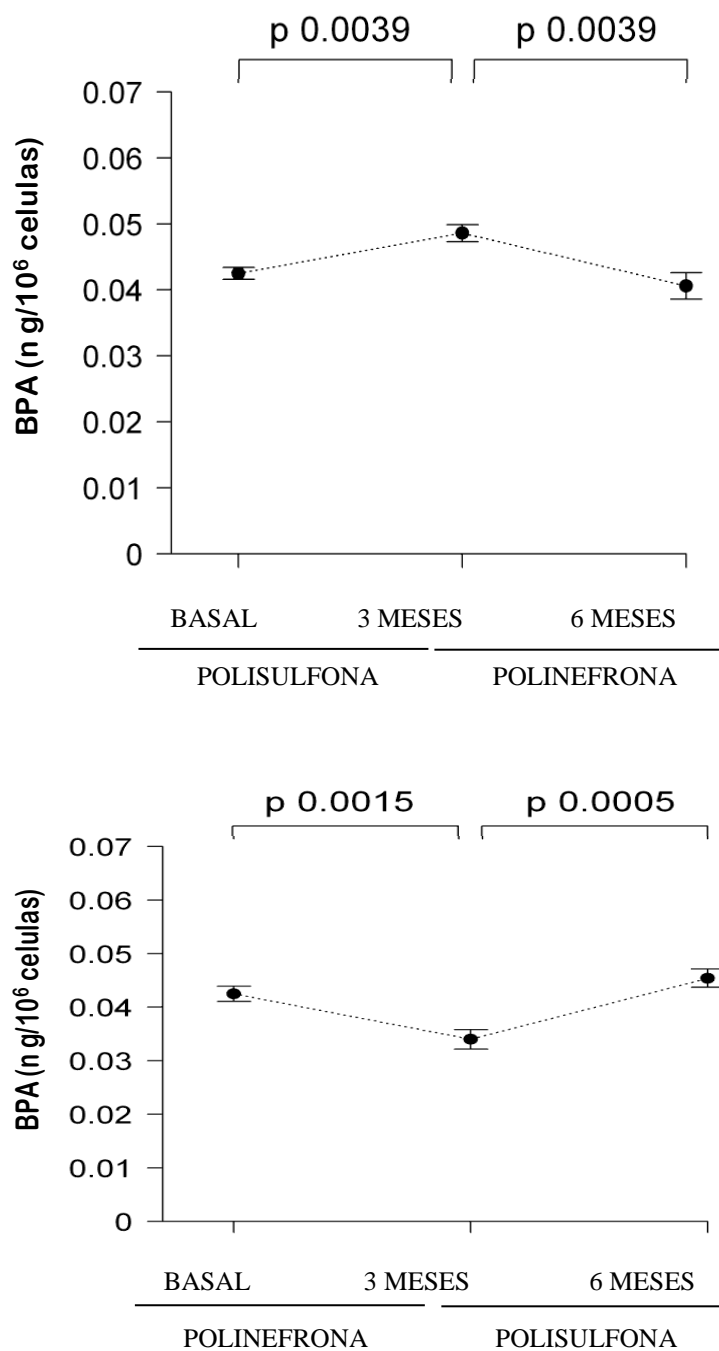


Figura 20. BPA intracelular en PBMCs de pacientes en hemodialisis dializados con membranas de polisulfona o con membranas de polinefrona. Valores de BPA intracelular en predialisis a lo largo de los 6 meses de estudio.

7. Marcadores de estrés oxidativo.

Se ha demostrado que el BPA genera un incremento de ROS intracelular disminuyendo la enzima glutatión (GSH) ¹²⁹ que es el principal antioxidante de las células. La disminución de expresión de GSH y un incremento en la generación de radicales libres podría ser el mecanismo para que BPA induzca daño ¹³⁰. Ante lo limitado de las muestras de PBMC's obtenidas de los pacientes y lo controvertido de las distintas formas de medir el estrés oxidativo, se decidió cuantificar la exposición a la misma, viendo la respuesta antioxidante desencadenada en respuesta al BPA.

A. Membranas de polisulfona en pacientes en Hemodialisis incrementa la expresion de genes antionxidantes en PBMC's.

En la literatura se ha descrito la relación entre BPA y estrés oxidativo, lo que da lugar a una respuesta antioxidante, activando mecanismos de defensa contra esos radicales libres superoxidos generados por la presencia de BPA. Para confirmarlo en células de sangre periferica, se han estudiado la expresion de diferentes genes implicados en la respuesta a estrés oxidativo, como son Nrf2, HO-1, NQO-1, SOD-1 y Catalasa.

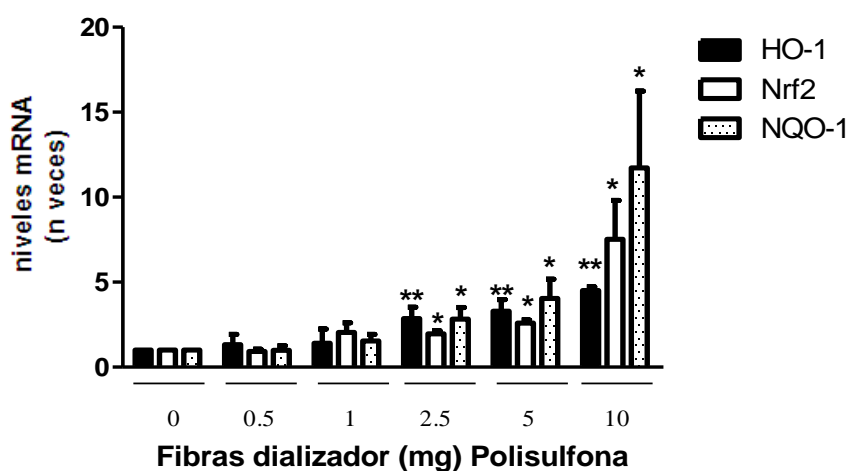


Figura 21 Fibras del dializador de polisulfona aumenta los niveles de ARNm de HO-1, Nrf2, NQO-1

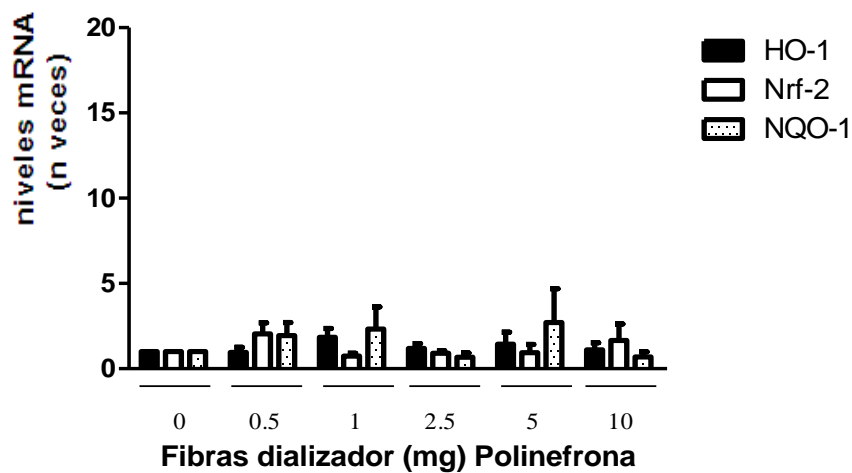


Figura 22. Fibras del dializador de polinefrona dependiente de la dosis no se observa cambios de expresión en dichos genes .

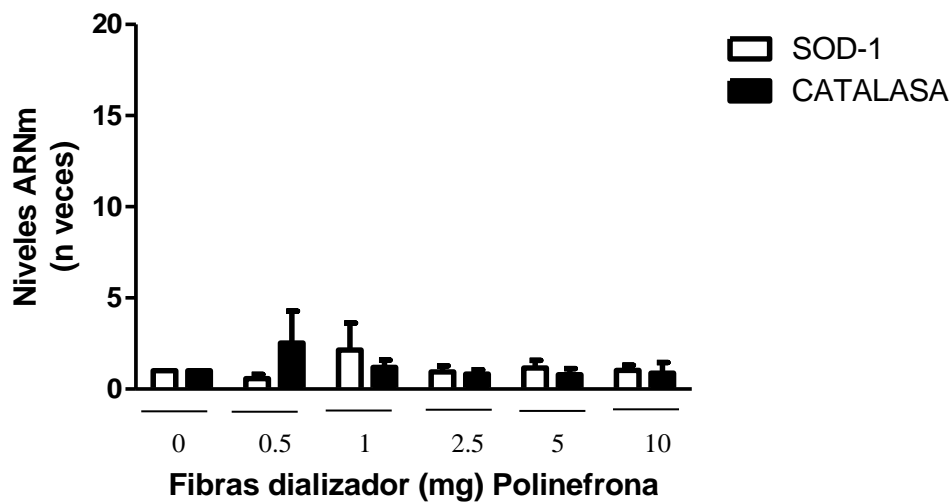


Figura 23. Fibras del dializador de polinefrona no tiene efecto sobre la expresion de los niveles de ARNm

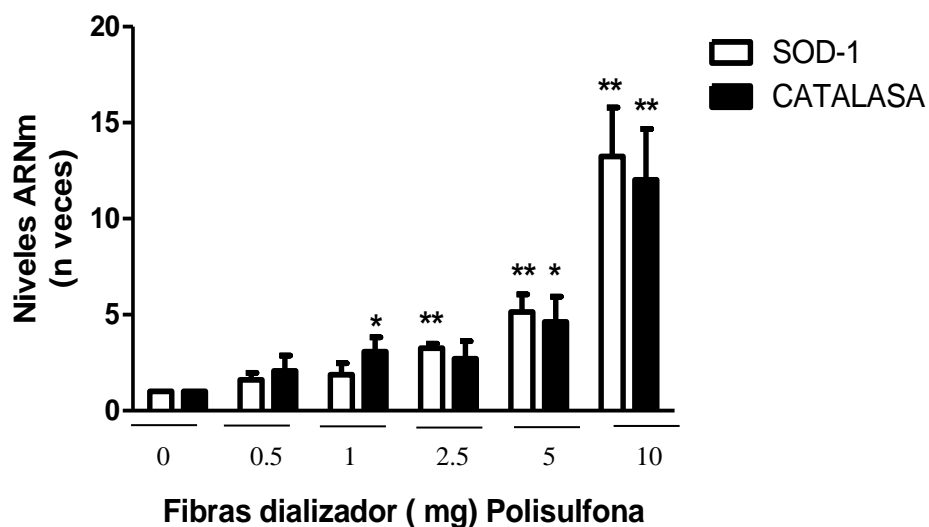


Figura 24 Fibras del dializador de polisulfona aumenta los niveles de ARNm para Catalasa y SOD-1.

Como se observa en la figura 21, el factor de transcripcion de Nrf2, HO-1 y NQO-1 cuanto mayor es el contenido de fibras de dializador con membranas de polisulfona que están en contacto con las PBMC's mayor es la expresión y de manera significativa mientras que aquellos pacientes que fueron dializados con membranas de polinefrona, al analizar la expresion de ARNm para estos genes involucrados en la respuesta antioxidante, no se observó ningun efecto (Fig 22-23).

El efecto es similar para los genes de SOD-1 y de Catalasa (figura 24). Las fibras de dializador que contiene BPA (Polisulfona) produce una mayor expresión de ARNm dependiente de la cantidad de membrana de dializador con el que estuvieron en contacto las PBMC's.

B. El uso de la membrana de polisulfona aumeta la expresion de proteínas Nrf2, HO-1 y Prx-1.

Hay estudios en animales en los que el tratamiento con BPA se produce una disminucion significativa estadísticamente en las actividades de catalasa, superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa, glutatión reductasa y glutatión-S-transferasa, así como en glutatión y contenido total de ácido ascórbico, sin embargo, hay un aumento significativo de malondialdehído (MDA) que deriva de la peroxidación lipídica ¹³¹. Se han abordado los efectos de BPA en las células y en muy pocos estudios se ha llevado a cabo el investigar el mecanismo de acción de bisfenoles en las células sanguíneas. Hay estudios en los que se demuestra que BPA y análogos del bisfenol causan, no solo daños en la morfologia de la célula (peroxidacion de lípidos o cambios en la proteínas) si no tambien provoca una respuesta antioxidante^{132,133}. En base a esto se analizó el efecto oxidante de BPA en PBMCs y para ello se ha analizado la via de elementos de respuesta antioxidante (ARE) inducida por Nrf2 (factor de transcripcion nuclear derivade eritroide 2) en cada uno de los dos dializadores usados en el estudio.

Se midieron marcadores de estrés oxidativo en 10 pacientes seleccionados al azar. El estrés oxidativo activa al factor de transcripcion Nrf2 que a su vez promueve la expresión de genes que codifican proteínas que protegen a las células del estrés oxidativo como hemoxigenasa-1 (HO-1) y la peroxirredoxina-1 (Prx-1), entre otros. La expresión de marcadores de estrés oxidativo fue significativamente mayor despues de 3 meses de hemodiálisis con membrana de polisulfona que con polinefrona (figura 25).

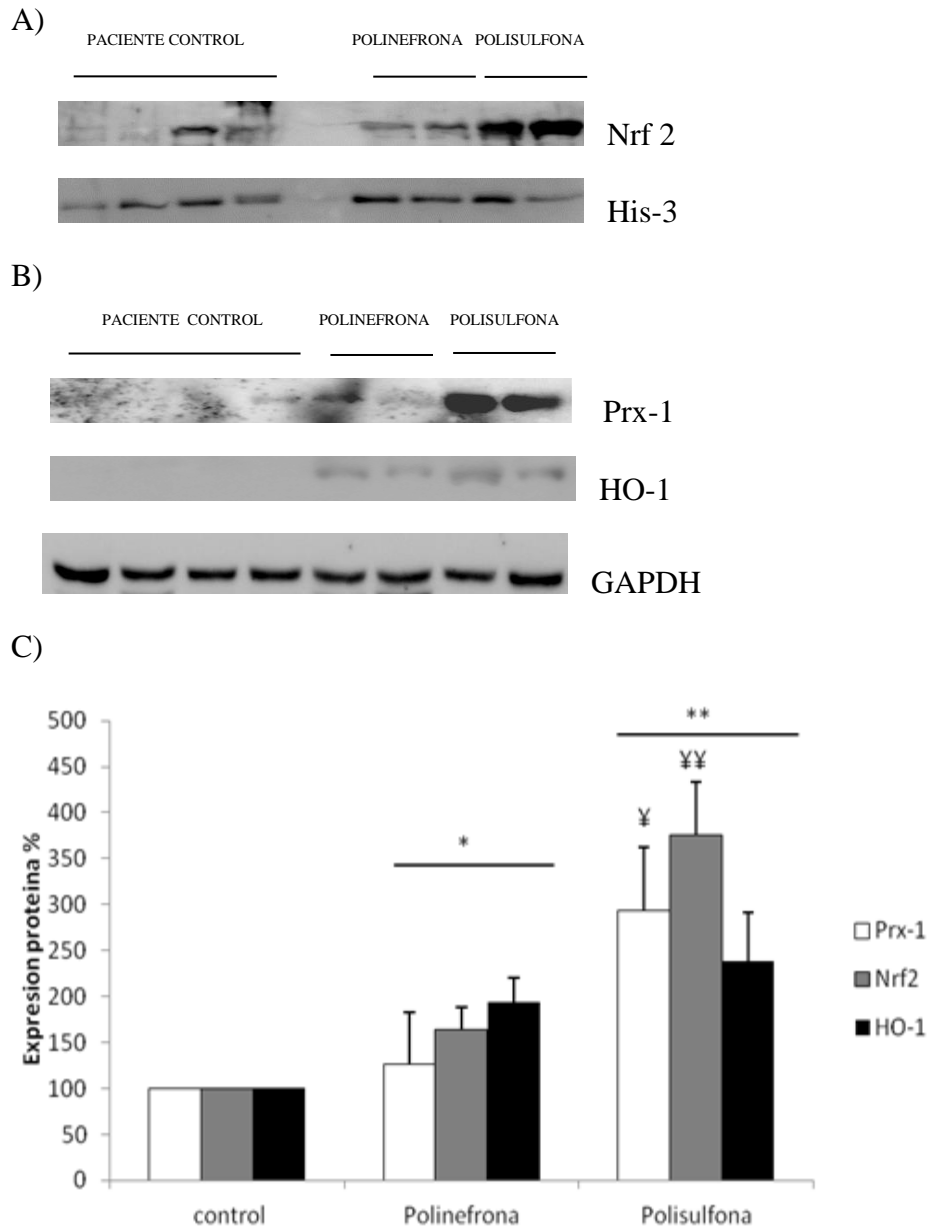


Figura 25. Expresión de proteínas de estrés oxidativo Nrf2, HO-1, Prx-1 en PBMCs en pacientes dializados durante tres meses con membranas de polisulfona o polinefrona. (A) Western blot de Nrf2 fracción nuclear y su control de carga His-3. (B) Western blot de HO-1 y Prx-1 fracción citosólica y su control de carga GAPDH. (C) Cuantificación de los resultados del western. Los valores expresados como porcentaje de aumento más saludable controles. * $P < 0,05$ versus control sano; ** $P < 0,001$ versus control sano; ¥ $P < 0,05$ frente polinefrona; ¥¥ $P < 0,01$ frente a polinefrona.

8. Marcadores de inflamación en PBMCs.

A. Membranas de polisulfona aumenta la expresión de IL-6 y PCR en pacientes en Hemodiálisis .

Las altas concentraciones de BPA en suero se han asociado con altos niveles de IL-6¹³⁴. Los marcadores de inflamación: IL-6 y la proteína C reactiva (PCR), en todos los pacientes involucrados en el estudio fueron medidos. A los 3 meses de la hemodiálisis con membrana de polisulfona se observó un incremento de IL-6 y de la PCR mientras que en aquellos pacientes en los que se usó las membranas de polinefrona el mismo tiempo en hemodiálisis, tanto la IL-6 como PCR disminuyeron (* P<0,01) (figura 26).

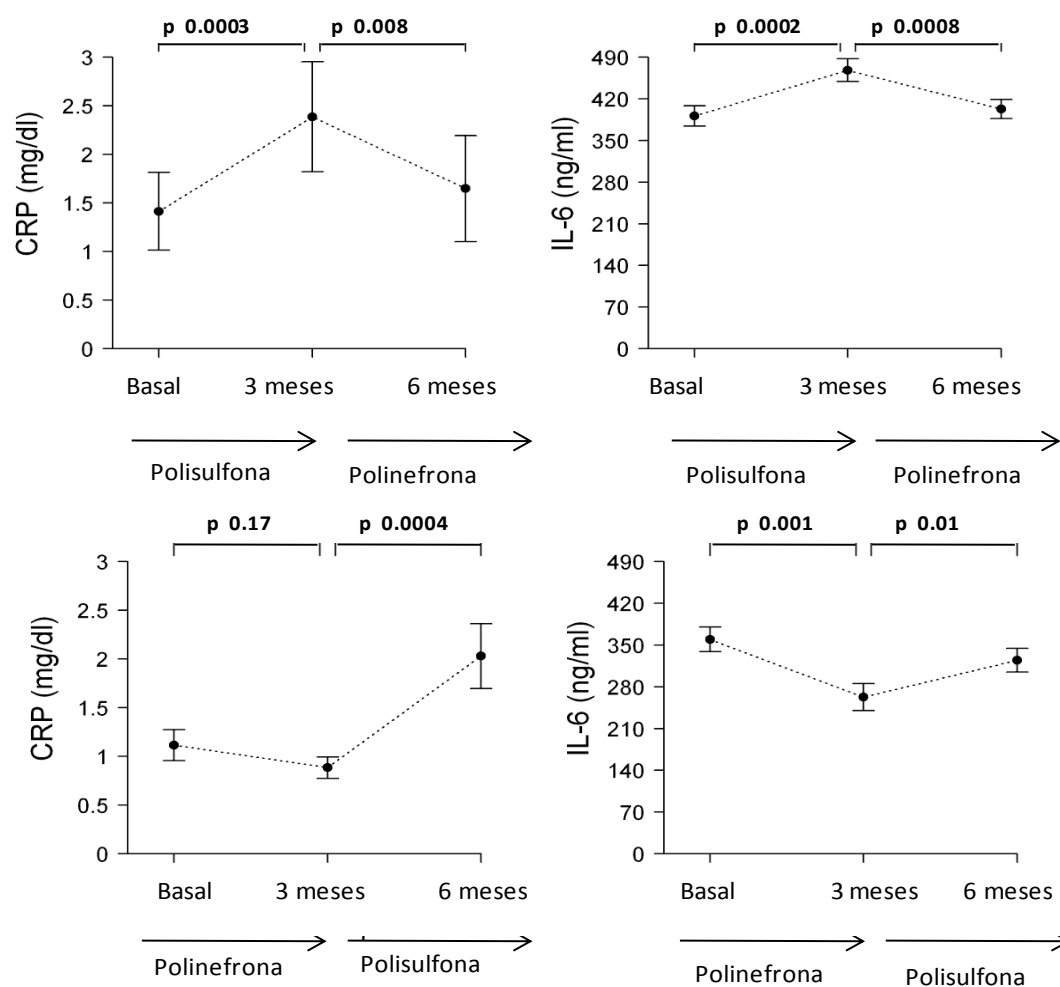
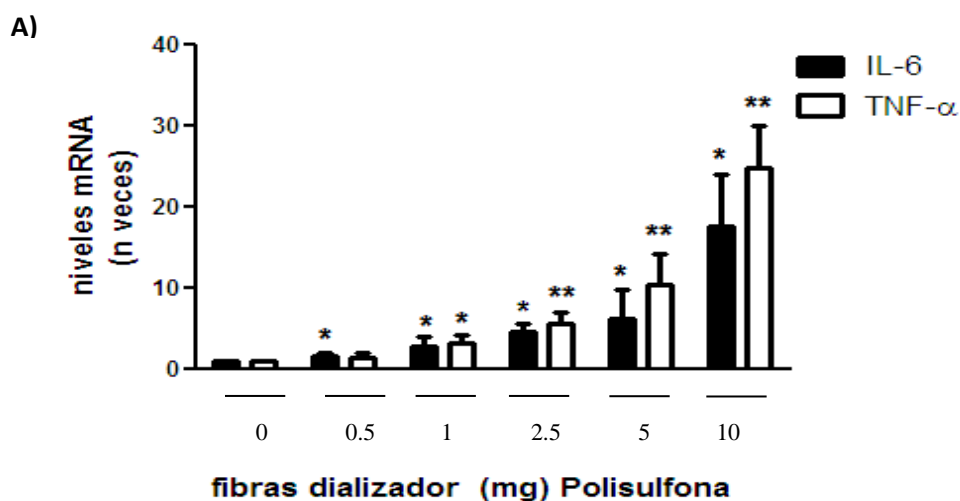


Figura 26. Circulación de biomarcadores inflamatorios en pacientes dializados con membrana de polisulfona o con membrana de polinefrona durante tres meses.

B. Membranas de polisulfona incrementan en PBMCs la expresion de genes inflamatorios IL-6 y TNF α .

La respuesta inflamatoria se ve inducido con diversos disruptores endocrinos¹³⁵ debido a los efectos sobre las ROS. Podemos esperar que el BPA ejerza un efecto inflamatoria también.

Para evaluar si el BPA presente en el dializador podía mediar respuestas proinflamatorias en cultivo de PBMCs, se realizaron varios estudios donde se coincubaron con fibras de membranas de polisufona y también de polinefrona. Las células PBMCs estuvieron en contacto con dichas trazas durante 24 horas. El estudio por PCR cuantitativa reveló que existía un aumento significativo en los niveles de ARNm de diversos genes proinflamatorios, para la citoquina IL-6 y la citoquina TNF α . Ese aumento es dependiente de la dosis, ya que cuantas más fibras de polisulfona había en contacto con las PBMCs aumentaba la expresión de IL-6 y TNF α . Estos mismos experimentos también se repitieron con el otro dializador, polinefrona, que no tiene BPA en su composición y al analizarlos se observó que para IL-6 y TNF α no había aumentos de una y otra citoquina (Figura 27).



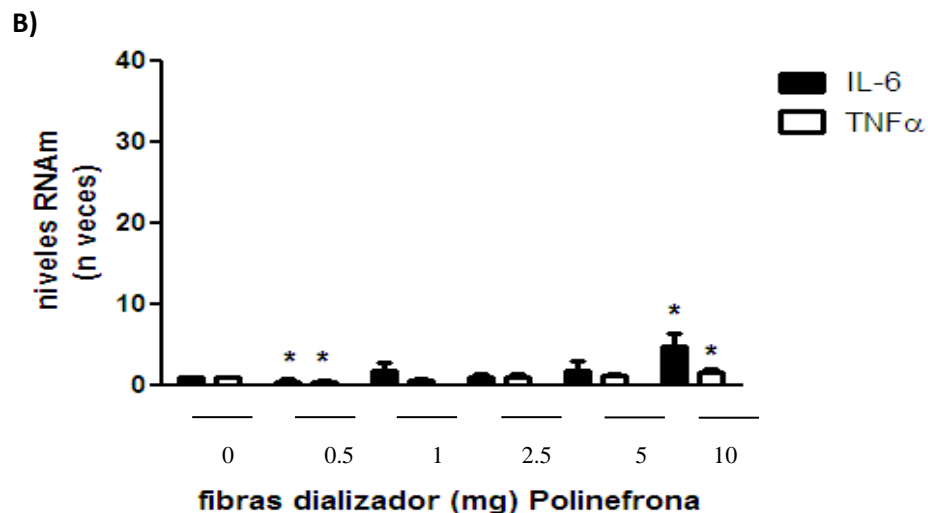


Figura 27. Evaluación de los niveles de ARNm de diversos factores en PBMCs . La gráfica muestra los niveles de ARNm, obtenidos mediante PCR a tiempo real, de IL-6 y TNFα en PBMCs incubadas con trazas de fibras de dializador de polisulfona y de polinefrona durante 24 horas. A) fibras del dializador que contienen BPA (polisulfona) dependiente de la dosis aumenta la expresión del ARNm de citoquinas. QRT-PCR. B) fibras del dializador libres de BPA (polinefrona) no tiene efecto sobre la expresión de ARNm de citoquinas. La media \pm SEM de 7 experimentos independientes. * $P < 0,05$ frente a control; ** $P < 0,001$ vs control

C. Membranas de polisulfona incrementan la expresión de citoquinas inflamatorias IL-6 y TNFα en PBMCs.

Se ha observado la respuesta inflamatoria en células para las citoquinas IL-6 y TNFα por BPA¹³⁶ por lo que se hicieron experimentos para saber si el BPA induce expresión de genes proinflamatorios, quisimos ver la síntesis de dichas citoquinas por ELISA en las mismas condiciones y usando las mismas concentraciones de BPA. Se observó un aumento de la síntesis de proteínas IL-6 y de TNFα en pacientes en hemodialisis que estuvieron usando membrana de polisulfona durante tres meses. Sin embargo para los pacientes que usaron la membrana de polinefrona durante el mismo periodo no hubo cambios para ambas citoquinas.

C)

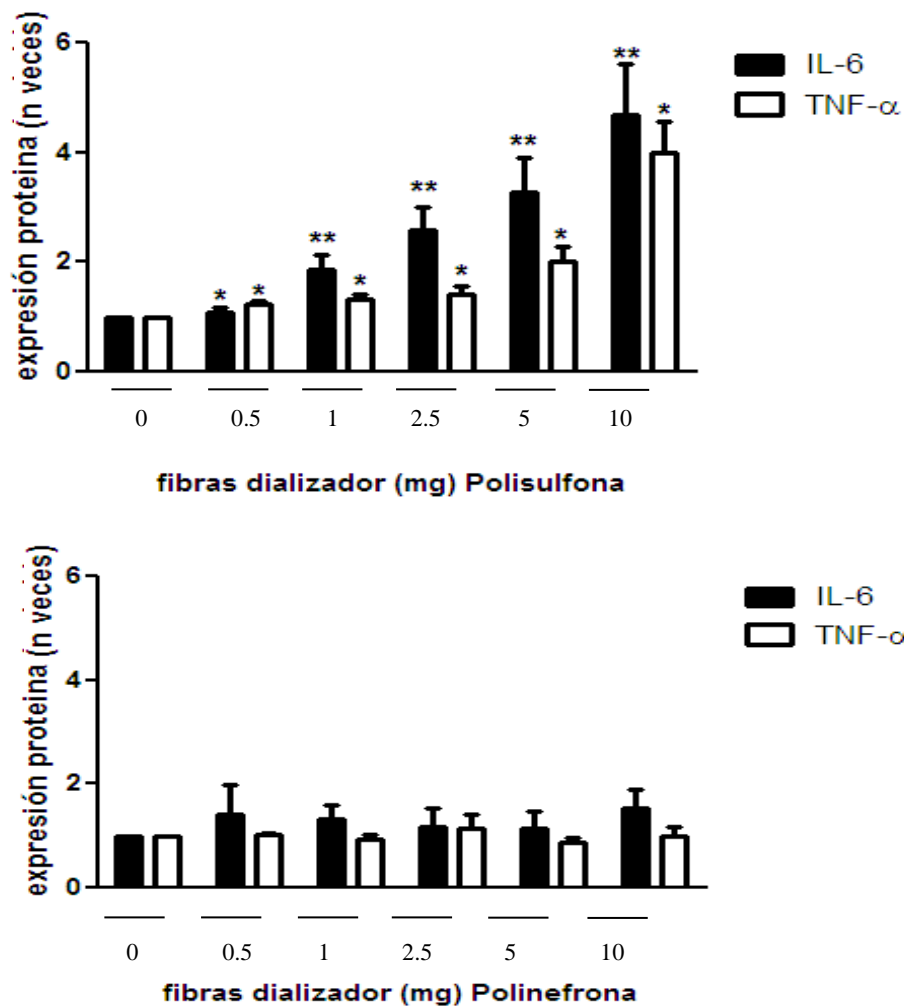


Figura 28. Membrana de polisulfona aumenta la expresión de IL-6 y de TNF α . C) Fibras del dializador que contienen BPA (polisulfona) dependiente de la dosis aumenta los niveles de citoquinas. ELISA. D) Fibras del dializador libre de BPA (polinefrona) en los niveles de citoquinas. La media \pm SEM de 7 experimentos independientes. * $P < 0,05$ frente a control; ** $P < 0,001$ vs control.

De igual manera se observa un aumento de la expresión de ARNm de citoquinas de forma dependiente de la dosis de BPA en PBMC's procedentes de pacientes sanos dentro de una concentración cuyo rango se encuentra dentro de los pacientes en hemodialisis analizados en el estudio.(Figura 29)

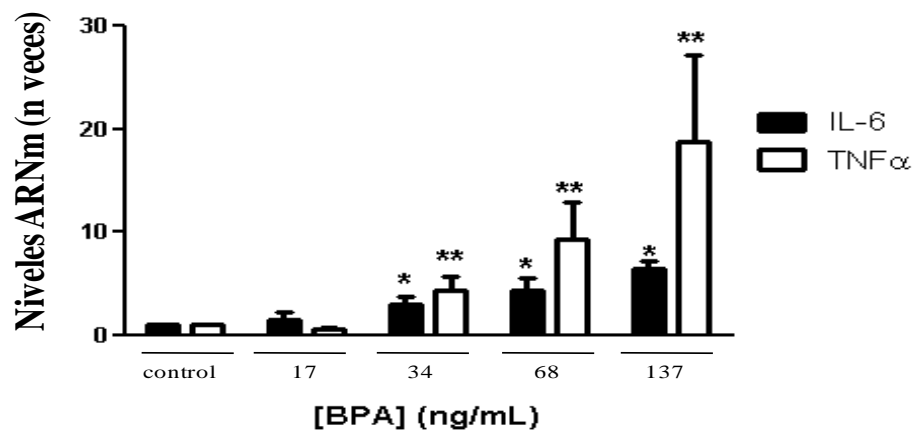


Figura 29. BPA es proinflamatoria. PBMC se cultivaron durante 24 horas en presencia de diferentes concentraciones de BPA. BPA aumenta dosis-dependiente la expresión de ARNm de las citoquinas inflamatorias TNF e IL-6. QRT-PCR.

En este sentido se quiso medir la cantidad de BPA liberado por las fibras de los dializadores en el medio de cultivo durante 24 horas. Para ello se recogieron muestras de los sobrenadantes donde se encontraban las células mononucleares junto con las fibras de uno y otro dializador. Como se puede observar en la figura 29 aquellos sobrenadantes que estuvieron en contacto con las fibras del dializador de polisulfona, los niveles de BPA se incrementan de forma proporcional al contenido en fibras mientras que para las fibras del dializador de polinefrona, las medidas de BPA fueron insignificantes ya que no tienen BPA en su composición.

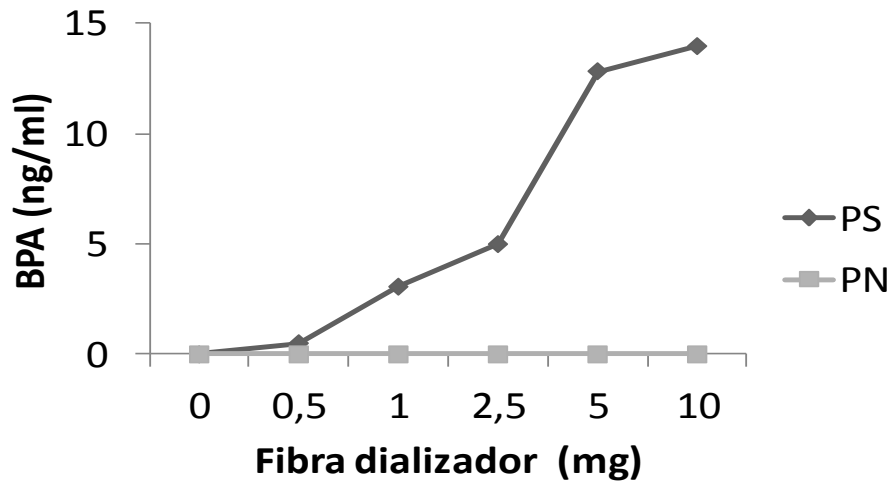
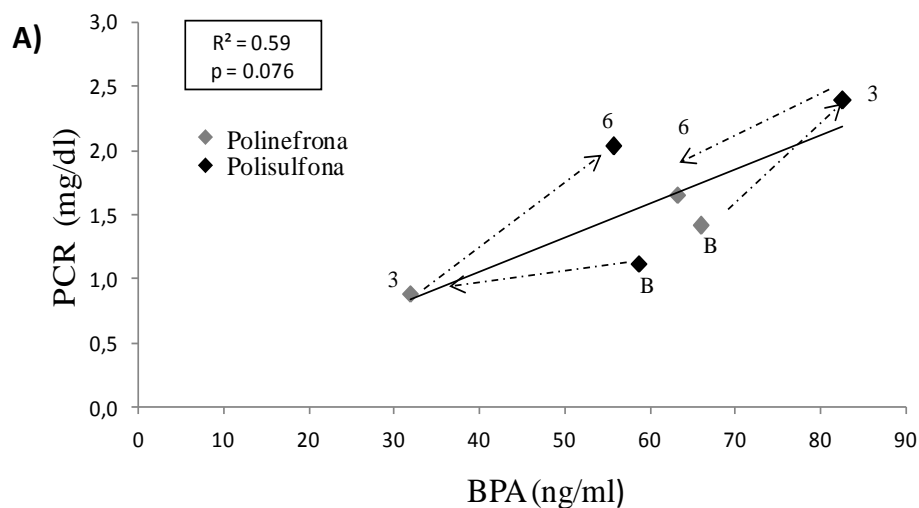


Figura 30. BPA se libera a los sobrenadantes de fibras dializador (polisulfona o polinefrona) en cultivo durante 24 horas (media de 2 experimentos).

D. Correlacion entre los niveles de BPA en suero de pacientes en Hemodialisis y marcadores de IL-6 y TNF α .

De igual manera se estudió si había una relación entre las concentraciones elevadas de BPA presentes en los sueros de los pacientes en hemodiálisis con los marcadores inflamatorios IL-6 y proteína C reactiva (PCR) durante el tiempo en el que fueron dializados con una membrana u otra. Como se puede observar en la figura 31 hay correlación entre los niveles de BPA en suero y los marcadores pro inflamatorios PCR e IL-6.



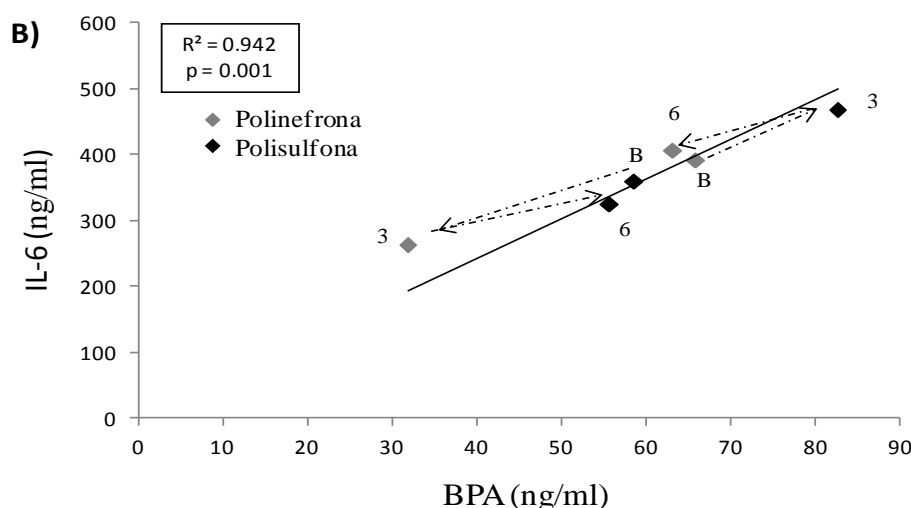


Figura 31. Correlación entre el BPA y marcadores inflamatorios. Se muestran los valores para cada grupo y tiempo en diálisis. BPA y los marcadores inflamatorios (A) PCR y (B) IL-6 se evaluaron en las mismas muestras. Las líneas discontinuas representan los plazos para los dos grupos independientes. El primer punto de datos (B) a lo largo de la línea discontinua representa los valores de referencia, la segunda (3) el punto de tiempo de 3 meses, y el tercero (6) el 6 meses punto de tiempo. Las flechas representan la secuencia de dializadores. El dializador es un código de colores. Este fue un estudio cruzado de pacientes prevalentes en hemodiálisis y cada grupo de pacientes independiente se sometió a diálisis al inicio del estudio con un dializador diferente. Por lo tanto, un grupo cambió de polisulfona al inicio a polinefrona y de nuevo a polisulfona, y el otro grupo cambió de polinefrona al inicio a polisulfona y de nuevo a polinefrona.

9. La exposición de BPA en células tubulares induce despolarización mitocondrial y apoptosis.

Por último, quisimos usar una línea celular renal (HK2) para ver el efecto del BPA en la generación de radicales libres vía mitocondrial y la apoptosis. Mitocondrias aisladas fueron analizadas por citometría de flujo por TMRM. Aunque las mitocondrias pueden ser purificados a través de sacarosa o gradientes de Percoll, hacerlo puede perder mitocondrias y / o subpoblaciones específicas durante el proceso de purificación. Por lo tanto, no se le dio importancia a la purificación para el análisis por citometría de flujo.

Se observó una población normalmente distribuida de 10.000 eventos. Partículas con tinción por debajo de 2 unidades de fluorescencia relativa se define como escombros y no están incluidos en el análisis final. FSC y SSC se utilizan habitualmente para caracterizar volumen de la partícula y la granularidad, respectivamente, aunque el FSC y SSC se han utilizado indistintamente para caracterizar el volumen de partículas muy pequeñas tales como bacterias y mitocondrias ¹³⁷⁻¹⁴⁴. TMRM es un colorante potenciométrico que se acumula en la matriz mitocondrial basado en el potencial de membrana-interno ¹³⁷. La figura 32 A) se ilustra células tubulares humanas (HK2) estimuladas con BPA a una concentración de 100 μ M a 24 h.

También se realizaron estudios de apoptosis en estas células tras estimulación con BPA, en las mismas condiciones en las que se realizó el estudio de despolarización de la membrana mitocondrial. Se observó que hay un aumento de muerte celular transcurrido el tiempo de incubación como se muestra en la figura 32B).

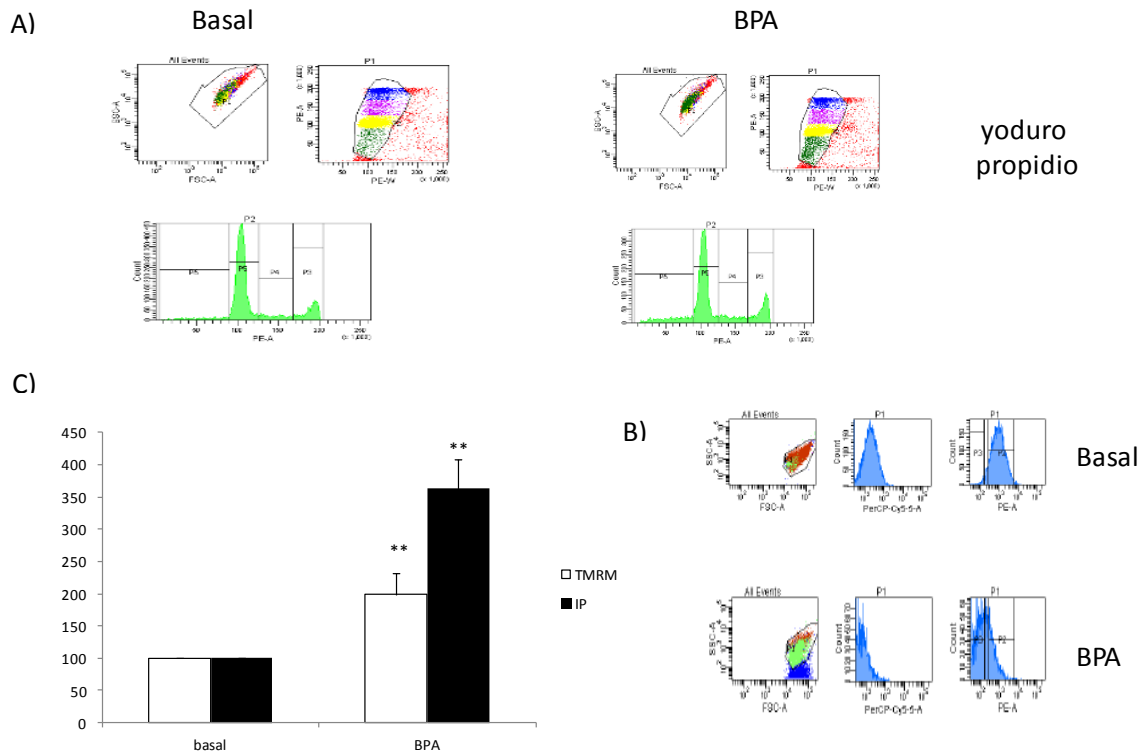


Figura 32. BPA disminuye potencial de membrana y produce muerte celular. A) Incubación de 24 horas con BPA 100 nM promueve muerte celular programada (apoptosis) en células tubulo-epiteliales. Las células se permeabilizaron y se tiñeron con yoduro de propidio para evaluar las células hipodiploides por citometría de flujo. Media \pm s.e.m. de cuatro experimentos independientes. ** $P < 0.01$ versus control. B) células tubulares se incubaron con BPA 100 μ M a 24 horas. Las células se tiñeron con tetrametilrodamina metil éster (TMRM), y la MMP se analizó por citometría de flujo. Media \pm s.e.m. de cuatro experimentos independientes ** $P < 0.05$ versus control. C) Cuantificación de ambos histogramas.

10.BPA induce generación de ROS en células tubulares .

Se analizó la generación de superóxido mitocondrial por microscopía de fluorescencia en HK2, utilizando dihydroethidium (MitoSOX Red, Molecular probe), como una sonda que se une a los ROS producido por la mitocondria (Figura 33). Tras 24 horas de estimulación con BPA, aumentó la generación de radicales libres en comparación con las células no tratadas. Como control positivo se usó H_2O_2 a una concentración de 25 μM .

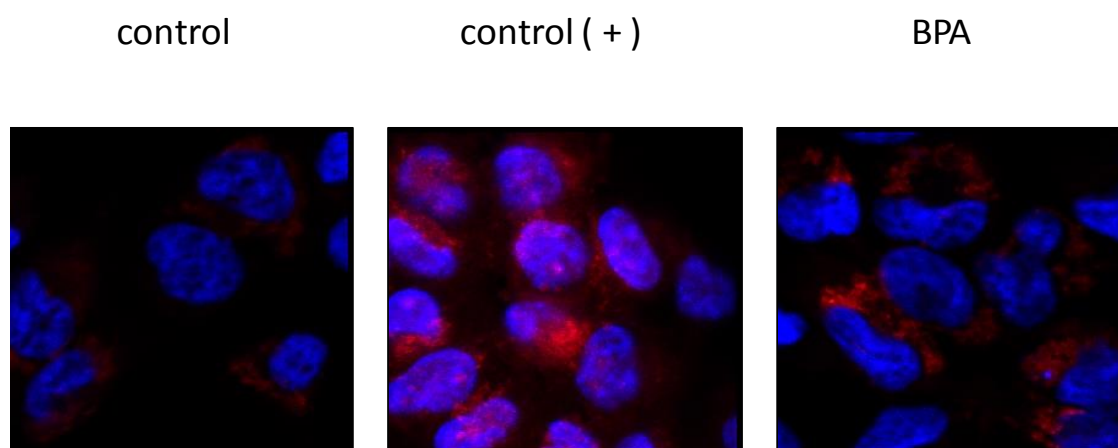


Figura 33. Estimulación con BPA genera ROS mitocondrial .La imagen muestra especies reactivas de hidrogeno en células túbulo epiteliales (HK2) tras 24 h de estimulación con BPA. Como control positivo se uso H_2O_2 a una concentración de 25 μM .

VI. DISCUSIÓN

A) BISFENOL (A) EN LA ENFERMEDAD RENAL CRONICA.

La Enfermedad Renal Crónica según datos del estudio Epidemiología de la Insuficiencia Renal Crónica en España (EPIRCE) ¹⁴⁵ afecta aproximadamente al 10% de la población adulta española y a más del 20% de los mayores de 60 años, y que, además, estaría siendo infra-diagnosticado en nuestro país.

En España, en datos publicados correspondientes a 2013, la incidencia global de pacientes con ERC subsidiarios de depuración extra-renal era de 124 pacientes por millón de población, en mayores de 15 años, 145 pacientes por millón de población y la prevalencia global era de 1122 pacientes por millón de población, en mayores de 15 años, 1314 pacientes por millón de población. Observándose, que en los últimos años no sólo hemos vivido un incremento notable en la prevalencia en los pacientes con ERC en tratamiento sustitutivo, sino que hemos experimentado un importante cambio en el perfil de la población tratada. La esperanza de vida de la población ha aumentado significativamente, lo que ha determinado que un mayor número de pacientes con enfermedades crónicas, como la diabetes mellitus, la hipertensión arterial o la arteriosclerosis, vivan lo suficiente como para desarrollar insuficiencia renal en sus estadios más avanzados y, por ello precisen de depuración extra-renal. Buena prueba de ellos, es que las características de la población tratada con diálisis suponen solo un 20 % de los pacientes que se mantienen en lista de espera de trasplante renal, a pesar de unos criterios de inclusión cada vez menos rígidos.

En los últimos tiempos, la exposición a determinadas sustancias químicas se ha instalado en nuestra vida diaria. Una de esas sustancias es el bisfenol A (BPA), 2,2-bis-(4-hidroxifenil)-propano, molécula utilizada en la síntesis de plásticos de policarbonato y en las resinas epoxi. Su uso está muy extendido en la fabricación de biberones,

dializadores, botellas para agua, refrescos, así como en el recubrimiento interno de latas y contenedores de comida y bebida. En 2009 se fabricaron alrededor de 6.000.000 de toneladas métricas de BPA a nivel mundial ¹⁴⁶

Este uso tan extenso de BPA, da lugar a la exposición generalizada en la población. Blot et al. ¹⁴⁷ estima que la cantidad máxima de ingesta humana diaria de BPA es de 1 mg / kg de peso corporal. La exposición a BPA ocurre preferentemente por vía oral, pero también debido a los selladores dentales, a través de la piel, por inhalación de productos de limpieza y en pacientes en diálisis a través de las membranas y carcasas de los dializadores. Incluso, el polvo es considerado un contribuyente menor (<10% de la exposición total) a la exposición diaria total de BPA. Más preocupante aún es la detección de agua subterránea y de ríos contaminados con BPA según estudios realizados en diversos países como España ¹⁴⁸, China y Japón ¹⁴⁹.

La exposición humana al BPA se estima que es principalmente por el consumo de alimentos y, de acuerdo con los peores escenarios, puede alcanzar los 40 µg / Kg peso corporal (Informe de la UE, 2003). Se ha informado de métodos para la determinación analítica de BPA en diversas muestras biológicas de roedores y seres humanos utilizando GC-MS, LC-MS / MS, y HPLC con detección electroquímica, mediante anticuerpos o fluorescencia. Las concentraciones en suero en individuos (población general) involuntariamente expuestos pueden variar desde por debajo de 1 µg de BPA / L hasta 19µg de BPA / L ¹⁵⁰⁻¹⁵².

Numerosos trabajos ^{148,153} consideran al BPA como un disruptor endocrino y han estudiado la posible relación entre la actividad hormonal (xenoestrógeno) del BPA y distintas alteraciones endocrino-metabólicas entre las que caben destacar trastornos hepáticos, tiroideos, obesidad, del comportamiento, resistencia a la insulina y aumento

a la susceptibilidad a la diabetes ¹⁵⁴. A la controversia existente se ha agregado el tema de la posible peligrosidad de las dosis bajas y si el umbral de exposición actualmente recomendado requiere revisión. Los efectos sobre la salud en los seres humanos se desconocen debido a la falta de datos epidemiológicos con un poder estadístico suficiente para detectar los efectos de las dosis bajas. El aumento de nivel de BPA orina se correlaciona con una disminución del nivel de concentración de espermatozoides, del nivel de espermatozoides total, del nivel de vitalidad de los espermatozoides, y disminución del nivel de la motilidad del espermatozoides en los hombres ¹⁵⁵ La concentración de BPA en la orina se correlaciona con los niveles hormonales alterados en los hombres ¹⁵⁶.

Como el BPA tiene una eliminación rápida completa por la orina (vida media: 6 horas), se considera que la excreción urinaria es el método más apropiado para evaluar la exposición al BPA.

- **ELIMINACION RENAL DEL BISFENOL (A).**

El BPA en condiciones normales se metaboliza en el hígado y se elimina por la orina. Estudios revelan que la excreción urinaria de BPA puede ser utilizado como biomarcador para la enfermedad renal ¹¹⁰. La excreción urinaria de BPA disminuye con el deterioro de la función renal y estas asociaciones difieren según la edad o el sexo. El estudio también revela que existe una correlación entre la excreción de BPA y filtrado glomerular (FG) ¹¹⁰. El BPA y sus metabolitos son eliminados por la orina ¹³⁻¹⁵.

Los estudios publicados sobre BPA y pacientes con ERC observan que hay un aumento de BPA en sangre. Pacientes con una disminución de la función renal presenta un aumento de BPA en suero y en pacientes en hemodiálisis los niveles fueron todavía más altos ¹²¹. Uno de los argumentos por los organismos gubernamentales para considerar el uso seguro de BPA en la población general es la eliminación urinaria casi completa de

la molécula conjugada¹¹⁹, disminuyendo los riesgos de la exposición al BPA. Por todo lo anteriormente mencionado, los pacientes con enfermedad renal son objeto de estudio ya que son más sensibles a la acumulación de BPA y su toxicidad potencial debido a la pérdida de los mecanismos fisiológicos de excreción de BPA en orina.

Kretier y cols. observan que a medida que desciende el FG aumentan los niveles séricos de BPA. En nuestro estudio demostramos que los niveles séricos de BPA en pacientes en diálisis, sin función renal residual, son muy superiores al grupo control con función renal residual. Esto confirma los estudios previos¹⁵⁹ que observan que la incapacidad para excretar BPA por orina redonda en un aumento de los valores séricos de BPA. Kanno et al observaron que los pacientes en hemodiálisis, la concentración de BPA ($5,3 \pm 0,3$ ng/mL) es mayor que en pacientes en diálisis peritoneal ($3,8 \pm 0,2$ ng/mL) y mayor que en personas con función renal normal ($2,6 \pm 0,1$ ng/mL)¹⁶⁰. El paciente renal no debería estar incluido en la disposición general por lo cual el BPA no es tóxico al eliminarse por el riñón, pues tienen alterada esta vía. Por tanto iría de acuerdo con las recomendaciones de cuidar la exposición al BPA de pacientes con ERC. Pero como ya hemos comentado, en este grupo estaría un 10% de la población española, muchos de los cuales desconocen presentar ERC y que por lo tanto acumulan el BPA en sangre y posiblemente en tejidos.

• BISFENOL (A) INTRACELULAR

El BPA es una molécula simétrica que contiene dos anillos aromáticos y dos grupos funcionales hidroxilo (OH) en los extremos, capaces de formar enlaces de hidrógeno. Esto determina las propiedades físicas de la molécula, que tendrá carácter anfipático, ligeramente apolar, teniendo una baja solubilidad en agua, siendo además dependiente

del pH del medio. Esto tiene un gran impacto desde el punto de vista toxicológico, dado que en sangre se encontrará unido a proteínas transportadoras dificultando su eliminación del organismo.

Sin embargo, en el caso del BPA, el posible problema se atribuye a su analogía a un tipo de hormonas, los estrógenos. Ambas moléculas tienen una estructura con una parte similar como se muestra en la figura 34, por lo que ambas podrían interaccionar con los receptores alterando el equilibrio hormonal e introduciéndose en el interior de las células.

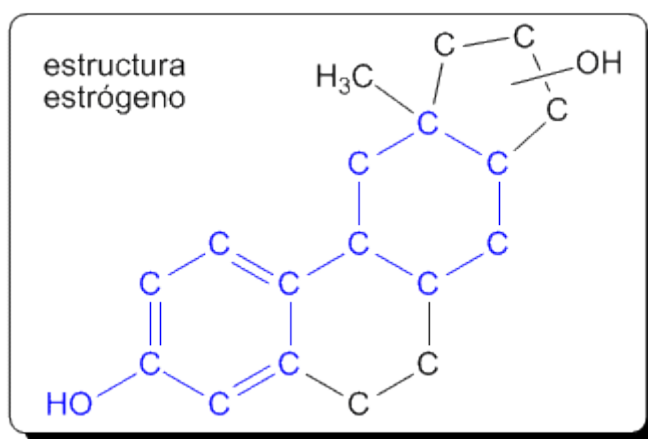


Figura 34. Estructura estrógeno.

Debido a esas propiedades el BPA es considerado un disruptor endocrino sintético, su internalización al interior de la célula es igual que el de una hormona. Ningún estudio había analizado antes la concentración intracelular de BPA aunque hay signos indirectos de su acción intracelular. En el diseño de la presente tesis decidimos analizar la concentración intracelular de BPA, al entender que es importante conocer no solo el comportamiento sérico, sino el intracelular también. Es conocida la acumulación del BPA en determinados tejidos, como en el hígado¹⁶¹ o a nivel intracelular¹⁶².

Se ha demostrado que el BPA actúa sobre diferentes receptores nucleares entre ellos PPAR-gamma⁹⁴ o receptor de esteroides y xenobióticos⁷⁴. El BPA puede tener un efecto nefrotóxico como consecuencia de su acción sobre los receptores PPAR- gamma. Benigni et al.¹⁶³ observó la actividad renoprotectora de la pioglitazona en células tubulares humanas, que es un receptor gamma activado por el agonista proliferador de peroxisomas (PPAR-gamma). Estudios con células HK-2 fueron transfectadas con plásmidos que albergan el gen de la luciferasa y pioglitazona, la actividad transcripcional de gen de la luciferasa fue incrementado ya que contiene elementos de respuesta proliferador peroxisoma putativo (PPRE). El aumento de la actividad de la luciferasa fue inhibido por BPA diglicidil éter (BADGE), un antagonista sintético de PPAR-gamma. .

Niveles bajos de BPA incrementan los niveles de estrógenos en el riñón ¹⁶⁴. El estrógeno modula negativamente el transportador de cationes orgánicos (CO) del riñón en mamíferos y contribuye a la diferenciación relacionado con el sexo en la excreción y acumulación de xenobióticos. Varios disruptores químicos endocrinos regulan negativamente transportadores que están involucrados en la acumulación renal y la excreción de xenobióticos en los animales. De acuerdo con Pelis et al.¹⁶⁵ los compuestos estrogénicos 17 β -estradiol (E2) y xenoestrógenos dietilestilbestrol (DES) tiene efecto en transporte CO renal, pero BPA no tiene efecto en este transporte. Ello podría ser debido a la débil actividad estrogénica de BPA.

En nuestro estudio los niveles de BPA intracelular en PBMCs fueron más altos en pacientes en hemodiálisis que en los controles sanos, lo que sugiere que hay una elevada acumulación de esta molécula en las células en pacientes con insuficiencia renal avanzada. Aunque se desconoce la biodistribución de esta molécula y su posible significado clínico, suponemos que esta internalización redundará en un descenso del

BPA circulante sérico, habiendo demostrado por primera vez en pacientes que existe un acumulo intracelular de BPA, conformando su papel toxico, y explica cómo una vez aumentado en sangre difunde al interior de las células. Por otra parte, la diálisis con membranas de polisulfona aumentaron más BPA intracelular, lo que sugiere que la carga de BPA de estos dializadores puede llegar al espacio intracelular, donde puede modular expresión de genes ¹⁶⁶. La implicación de los niveles intracelulares de BPA deberá ser bien estudiada.

B) BISFENOL (A) Y MEMBRANAS DE HEMODIÁLISIS.

La hemodiálisis constituye la modalidad terapéutica más ampliamente utilizada en el mundo para el tratamiento de la ERC. Muchos han sido los avances médicos y tecnológicos en el campo de la diálisis en los últimos años, desde el desarrollo de monitores “inteligentes”, membranas de mayor permeabilidad y biocompatibilidad, la utilización de bicarbonato como buffer, el mayor control del agua de la diálisis y muchos otros que han permitido que pacientes de mayor edad y pluripatología puedan beneficiarse de este tratamiento.

La hemodiálisis convencional puede considerarse una terapia sustitutiva renal que garantiza resultados razonables a corto plazo. Sin embargo, los resultados clínicos a largo plazo podrían mejorarse. La desnutrición y la inflamación son comunes, el control de la hiperfosforemia, la hipertensión y la insuficiencia cardíaca son pobres, la rehabilitación y la calidad de vida son subóptimas y las tasas de hospitalización y de mortalidad son altas. La causa más común de mortalidad en pacientes en HD de forma crónica es la enfermedad cardiovascular, que es la causa atribuida de muerte en aproximadamente el 50% de los pacientes ¹⁶⁷. El paciente en diálisis es por lo tanto un paciente con situación inflamatoria crónica, de origen multifactorial. Uno de los factores

responsables es la propia diálisis. No solo por ser incapaz de depurar moléculas proinflamatorias por su tamaño, por unirse a proteínas o por su localización intracelular, sino porque las propias membranas no son completamente biocompatibles. Se ha estudiado ampliamente la biocompatibilidad de diferentes membranas, pero uno de los factores, muy poco estudiado, es el hecho de tener en su composición material, que, como el BPA, pueden ser responsables de una menor biocompatibilidad.

Diversos estudios han evaluado la biocompatibilidad de las membranas de diálisis, el tipo de membrana puede influir generando mayor o menor estrés oxidativo, uno de los mecanismos básicos es una menor producción de ROS resultado de una menor estimulación de los procesos inflamatorios y una mayor eliminación de toxinas urémicas que participen en la producción de ROS ¹⁶⁸⁻¹⁷⁰. También como se demuestra en un reciente meta-análisis ¹⁷¹ el uso de agua ultrapura en el baño de diálisis se asocia con una disminución significativa en varios marcadores de inflamación, incluyendo PCR e IL-6, también a una mejora significativa en la albúmina plasmática, como marcador de la nutrición y la inflamación, y a una mejora en varios parámetros de anemia, con un aumento en el nivel de hemoglobina asociado a una disminución de la dosis semanal de eritropoyetina. En este sentido se han conseguido grandes avances, mejorando la biocompatibilidad de las membranas, la calidad del agua de la diálisis, reduciendo el número de catéteres intravasculares como acceso vascular para hemodiálisis, intentando evitar la sobrehidratación de los pacientes en diálisis, y por supuesto el tipo de técnica de depuración extra renal.

Se han encontrado niveles séricos de BPA elevados en pacientes en hemodiálisis en comparación con los pacientes con normalidad de la función renal, lo cual es consistente con las observaciones anteriores que el BPA sérica aumenta cuando la tasa de filtración glomerular cae por debajo de 60 ml / Min.¹²². En este sentido, nuestros datos apoyan la

hipótesis de que los pacientes en hemodiálisis representan una población de alto riesgo de sobrecarga de BPA, que puede influir en la situación de los dispositivos médicos que contiene en su composición BPA. El BPA debe migrar de los dializadores a la sangre en los pacientes en hemodiálisis¹²³

El propósito de esta tesis fue analizar de forma prospectiva el impacto del uso de los dializadores libres de BPA tanto en capilares (polinefrona) como en la carcasa, en los niveles de BPA en suero de los pacientes en hemodiálisis en comparación con el uso de dializadores que presentan en su composición BPA en los capilares (polisulfona). Así, estudiamos solo la influencia del material de los capilares con los valores de BPA sérico. El principal hallazgo es que la elección del dializador en términos de los impactos de contenido de BPA en una sola sesión de diálisis y después de 3 meses de uso continuo del mismo tipo del dializador, influye en los niveles de BPA en suero. Esto demuestra que el dializador que contiene BPA puede contribuir en la concentración de BPA en los pacientes en hemodiálisis. El ensayo de elución de BPA de los sueros de pacientes en antes de la diálisis, demostró que se encontró una mayor cantidad de BPA para pacientes dializados con polisulfona (PS). El único estudio similar fue el realizado por Kretier et al. quienes compararon 2 membranas una con y otra sin BPA, pero ambos dializadores con una carcasa de policarbonato que contiene BPA, la cual es un factor adicional de liberación de BPA como ya comentamos. El baño de diálisis está en íntimo contacto con la carcasa, que puede desprender el BPA que pasaría directamente a la sangre. Este grupo no encuentra diferencias entre los dializadores estudiados, polietersulfona de alto flujo (Purema H, se hace referencia como PUR-H), polisulfona de alto flujo (referido como HF-PSU), y bajo flujo de polisulfona (referido como LF-PSU). El tiempo de estudio fue de 4 semanas. La concentración in vitro de BPA eluido del dializador con la sangre en condiciones acuosas variaron para los tres dializadores

siendo muy bajo para PUR-H ($6,2 \pm 2,5$ ng; $p < 0,001$), intermedio para HF-PSU ($48,1 \pm 7,7$ ng), y más alto para LF-PSU ($140,8 \pm 38,7$ ng; $p < 0,01$). En un estudio cruzado de 152 pacientes prevalentes con ERC, la concentración de BPA en plasma comenzó a incrementarse después de la etapa 3. Pacientes en hemodiálisis de mantenimiento tenían concentraciones más de seis veces más altos de BPA que los pacientes con ERC estadio 5 prediálisis ($10,0 \pm 6,6$ vs. $1,6 \pm 1,8$ ng / ml; $p < 0,001$). En el estudio controlado aleatorio, las concentraciones plasmáticas de BPA eran muy elevados en comparación con los controles sanos (rango de $9,1 \pm 4,5$ a $12,0 \pm 6,0$ ng / ml vs. $\leq 0,2 \pm 0,1$ ng / ml; $p < 0,001$), pero ningún cambio en los niveles de BPA en plasma se observó durante la hemodiálisis con cualquiera de los tres dializadores en el curso de un solo tratamiento y durante un período de 4 semanas.

Así en este estudio el hecho de su corta duración y el que los dializadores con membranas de polisulfona y polinefrona presentaban BPA pueden explicar la falta de diferencias entre una y otra membrana ¹²². Por el contrario, nosotros encontramos diferencias en los niveles de BPA en suero después de 12 semanas de uso con dializadores que contienen BPA. A diferencia del estudio realizado por Krieter et al, en nuestro estudio la carcasa de los dializadores de polinefrona son libres de BPA. Por lo que, la combinación de una exposición más larga (3 meses frente a 1 mes) y el uso de dializadores completamente libres de BPA en un grupo de pacientes, permitió la identificación de una contribución significativa de BPA en los pacientes en hemodiálisis que fueron tratados con membranas que contienen BPA. A este respecto, se hizo un estudio piloto en pacientes incidentes a unos tiempos más cortos (3 semanas), y con un grupo de pacientes más pequeño ($n = 7$ observándose que el uso de membranas de polisulfona tiene la misma tendencia aumentar los niveles de BPA en suero de pacientes. Los estudios previos también han sugerido que estos dializadores desprenden

BPA a la circulación, aunque los estudios fueron in vitro o solo en una única diálisis realizado en membranas obsoletas. Así en un único lavado de solución salina, se libera más BPA en las membranas de diálisis de polisulfona con carcasa de policarbonato (que contienen BPA) que membranas de diálisis de polisulfona con carcasa de poliestireno libre de BPA, lo que sugiere un papel potencial para la carcasa en la modulación de BPA en suero ¹²⁵. En otro estudio, una sola sesión de hemodiálisis dio lugar a un aumento de niveles séricos de BPA en los pacientes dializados con polisulfona, pero no en los que se dializan con membranas de celulosa ¹²¹. A pesar de que la masa molecular del BPA es 228 D y debido su carácter apolar, tiene afinidad por proteínas para poder transportarse en el torrente sanguíneo, la eliminación de BPA por hemodiálisis es limitada ¹²². La fracción de BPA unida a proteína en plasma en pacientes en diálisis se estimó entre 74% al 65% ¹⁵⁹, similar a valores que se obtuvieron in vitro del 95% de unión a bajas concentraciones ¹⁷². Los dializadores son una fuente adicional de BPA, pero las diferencias en el contenido de BPA eluible no están asociados con un efecto significativo sobre los niveles plasmáticos de BPA en pacientes en diálisis. Debido a la alta unión a proteínas, la eliminación de BPA por hemodiálisis es limitada.

Se desconoce si este aumento de BPA en pacientes en diálisis tiene una repercusión directa sobre la situación clínica de estos pacientes. De esta manera, el BPA podría afectar al sistema endocrino o sistema metabólico de los pacientes que van a recibir tratamiento de hemodiálisis ¹²¹. Cuando se ha analizado lo que ocurre con membranas de hemodiálisis que contienen BPA tanto con suero bovino como con etanol se observa un aumento de la concentración de BPA después de pasar por el dializador, pero es superior cuando se usa suero bovino ¹²³. Eso podría extrapolarse a pacientes en hemodiálisis de manera que el suero del paciente al pasar por la membrana sería capaz

de hacer pasar BPA a la sangre. Esto ha podido constatarse con nuestro estudio, de manera que incluso con peses de una sesión, aumentan los niveles séricos de BPA.

Por otra parte, Csanády et al determinaron coeficientes de partición en tejidos humanos a 37°C para BPA, y su unión inespecífica a las proteínas séricas humanas. Los coeficientes de reparto se obtuvieron mediante la incubación de la sangre que contiene BPA con cada uno de los siguientes tejidos: cerebro, hígado, riñón, músculo, grasa, placenta, glándula mamaria, y la glándula adrenal. La solubilidad o coeficiente de reparto (K) fue de 1,4 para tejidos no adiposos mientras que para los tejidos adiposos el valor de K fue 3.3. Esta mayor unión a células lipídicas compromete la dializabilidad de BPA, al ser un tejido de más difícil intercambio ¹⁷². Por lo tanto, la disminución observada en la concentración de BPA después de la diálisis crónica con membranas de polinefrona puede tener un componente importante en la disminución del BPA libre en la sangre, pero pensamos que es difícil que depure el BPA presente en tejidos, especialmente aquel almacenado en tejido graso.

Nuestro estudio argumenta en contra de un papel significativo de la técnica hemodiálisis en el aclaramiento de BPA debido a que no se observó una reducción significativa de BPA en suero después de una sola sesión de diálisis. Esta observación está en consonancia con los niveles más altos de BPA en suero en pacientes en hemodiálisis que en los controles sanos. Además, nuestros resultados sugieren que dializadores con membrana de polisulfona pueden incrementar niveles de BPA y el uso crónico de dializadores libres de BPA pueden disminuir dichos niveles. No es posible determinar las causas por las cuales los dializadores de BPA reducen los niveles de BPA, pero se pueden hipotetizar varias causas: puede ser que la propia metabolización por las células, o su acúmulo en determinados tejidos, así como no se puede descartar que el BPA libre pueda ser eliminado por la propia hemodiálisis al tener un peso molecular muy

pequeño. La exposición al BPA de manera reiterada puede conducir a la acumulación de BPA en los órganos diana. El paciente en hemodiálisis tendría por lo tanto dos posibles mecanismos de entrada del BPA, la vía oral y la propia de la hemodiálisis. Pero a través de la segunda no existiría conjugación hepática en el primer pase dada su administración intravenosa al contrario que el BPA liberado de envases de alimentos y absorbido desde el tracto gastrointestinal.

C) INFLAMACION Y OXIDACION.

El estrés oxidativo y la inflamación contribuyen a la enfermedad cardiovascular en pacientes con ERC ¹⁷³. En ERC avanzada se caracteriza por un incremento del estrés oxidativo y una inflamación sistémica de bajo nivel, que puede ser controlada mediante la medición de PCR o IL-6 ^{174,175}. La uremia en sí mismo y las sesiones de hemodiálisis pueden contribuir al estrés oxidativo y la inflamación.

Chepelev et al, en sus estudios in vitro en HEK 293, propuso que el BPA estimula la vía NRF2 / ARE debido a un incremento de los niveles de mRNA de HO-1 y NQO1 ¹⁷⁶. El BPA induce disfunción mitocondrial e inflamación ^{177, 178}, que es una característica clínica habitual en los pacientes en diálisis ¹⁷⁹. Esta inflamación es multifactorial en su origen, relacionándose entre otros con la pérdida de la función renal (retención de oxidantes que deben ser eliminados en la orina como el fenol indoxyl carboxilo, la metilguanidina y los lípidos oxidados) ¹⁸⁰ las comorbilidades (edad avanzada, diabetes mellitus, inflamación crónica, uremia, desnutrición grave y los factores asociados a la diálisis per se), o el propio procedimiento de la diálisis. Las consecuencias de la inflamación tienen una importante implicación en un amplio abanico de procesos, como el síndrome malnutrición-inflamación, la calcificación vascular y disfunción endotelial,

la resistencia a la insulina o la depresión. Esta situación constante de micro-inflamación en los pacientes en diálisis, les otorga un riesgo elevado de presentar complicaciones cardiovasculares y, por tanto, mayor mortalidad cuando se comparan con la población sin ERC¹⁸¹ Este hecho ha condicionado que en la última década la inflamación sea objeto de estudio y se han propuesto potenciales intervenciones para intentar disminuirla, ya que esto podría mejorar su pronóstico.

La exposición al BPA está relacionado con la inflamación-oxidación y enfermedades cardiovasculares en seres humanos y en roedores y cultivo celulares.^{182,183} La presencia de BPA en la orina, es una marcador de exposición al BPA en la población general y se asocia con marcadores del estrés oxidativo (malondialdehído y 8-hydroxydeoxyguanosine) y la inflamación (recuento de células blancas de la sangre y los niveles de PCR) en ciertas subpoblaciones tales como posmenopáusica y mujeres embarazadas¹⁸⁴. Kabuto et al¹⁸⁵ sugieren que la exposición al BPA durante el desarrollo embrionario y la infancia induce estrés oxidativo en el tejido, peroxidación en el riñón y también induce una sobreproducción de peróxido de hidrógeno. Un aumento del nivel de catalasa, glutatión peroxidasa y sustancias reactivas con el ácido tiobarbitúrico fueron observadas en riñones de ratones tratados con BPA. Las especies reactivas de oxígeno tales como radicales hidroxilo, aniones de peróxido, radicales peroxilo y peróxido de hidrógeno son citotóxicos. Estas ROS generada por BPA producen daños a lípidos de membrana, DNA y proteínas en las células¹⁸⁶. El estrés oxidativo surge del desequilibrio entre la producción de sustancias reactivas derivadas del oxígeno (ROS) y los mecanismos de defensa antioxidantes³². En condiciones normales ambos sistemas se encuentran en equilibrio de modo que un incremento en la producción de ROS va acompañado de un incremento en la defensa antioxidante.

El incremento de estrés oxidativo en los pacientes dializados, parece ser consecuencia de la acumulación de compuestos con capacidad pro-oxidante o resultado de la activación de ROS por neutrófilos y plaquetas, o a la depleción de antioxidantes debido a su consumo o eliminación durante el proceso de diálisis^{32,187,188}

El estrés oxidativo durante los procesos de hemodiálisis depende en parte de la biocompatibilidad de las membranas. El estrés oxidativo se produce durante la hemodiálisis, como consecuencia de una activación del complemento y de los leucocitos de la sangre al contacto con la membrana artificial de la diálisis, lo que puede promover la producción de radicales libres¹⁷¹. Incluso una sola sesión de hemodiálisis puede aumentar la peroxidación lipídica y disminuir los antioxidantes^{169,189,190}. Cuando la producción de radicales libres excede las defensas antioxidantes disponibles, se produce la reacción de los radicales libres, causando peroxidación de lípidos, desnaturalización de las proteínas y daño vascular¹⁹¹. La exposición de las células a BPA causa un aumento significativo de ROS intracelular y una reducción significativa en el nivel de glutatión (GSH)¹²⁹. El agotamiento de GSH y el aumento producción de radicales libres podría ser el mecanismo para que BPA induzca citotoxicidad y apoptosis en las células de la pulpa dental humana¹³⁰. que es el principal antioxidante de las células, es ubicuo y ayuda a protegerlas de las especies reactivas del oxígeno como los radicales libres y los peróxidos¹⁹².

En este trabajo se estudió la expresión de genes en respuesta a la inflamación y al estrés oxidativo en los pacientes en hemodiálisis, con dializadores con y sin BPA para observar las diferencias. Para ello analizamos la expresión de genes de Il-6, TNF α , para la inflamación y Nrf-2 (Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like)2, NQO-1, SOD-1, Catalasa y HO-1 y de proteínas como Nrf-2, HO-1 y Prx- para el estrés oxidativo. Se observó un aumento de estas enzimas, tanto en expresión de ARNm como proteica, y

cuando analizamos su relación con el BPA observamos que era mayor cuanto mayor era la concentración de BPA. Se demuestra el efecto del acumulo del BPA en los pacientes desde el punto de vista de la inflamación y el estrés oxidativo. Hay muchos estudios en animales en los que se ha demostrado que el BPA induce daño en podocitos y en la hormona tiroidea ^{113,193}, produce hipertensión ¹¹⁴, daño pancreático en células α y β ¹⁹⁴. La observación anterior indica que la exposición al BPA en la edad adulta puede interrumpir la normal homeostasis de la glucosa que conduce al desarrollo de la diabetes tipo 2 o también puede inducir daño neuronal ⁸⁹. El BPA, como se ha comentado anteriormente, se comporta como una hormona por lo que sus receptores celulares que se van a ver implicados en la señalización serán los receptores nucleares. Kafi et al. ¹⁹⁵, en un estudio electroquímico, observó que el BPA a la concentración de 300 nM induce estrés oxidativo y citotoxicidad en células de neuroblastoma mediante la modulación una variedad de vías de señalización celular. Lin et al. ¹⁹⁶ estudiaron el efecto citotóxico de BPA en las células neuronales dopaminérgicas. El BPA a concentraciones de 100 μ M aumenta especies reactivas de oxígeno intracelular (ROS) y de ese modo ejerce citotoxicidad. El exceso de estrés oxidativo es tóxico, ejerciendo efecto citostático, causando daños en la membrana y la activación de las vías de la muerte celular (apoptosis y/o necrosis). El BPA puede inducir roturas en la hélice de DNA ¹⁹⁷. Modificaciones en la hélice de DNA aumentan la citotoxicidad de las células expuestas e induce efectos mutagénicos / cancerígenos. En células de la pulpa dental en humanos la expresión de HO-1 es crucial para el mecanismo de defensa contra la toxicidad del BPA posiblemente a través de la compactación de especies reactivas del oxígeno ¹⁹⁸. Nuestros datos están en concordancia con lo observado por Chang et al, dio lugar a un aumento de HO-1, que es una de las proteínas junto con NQO-1 y SOD-1 se sintetizan tras activación del factor de transcripción Nrf-2, en la expresión de proteína como de

ARNm por BPA. En células tubulares (HK2) al estimularse con BPA no solo produce radicales libres si no también apoptosis y despolarización de la membrana. Que el BPA sea capaz de inducir efectos en el ciclo celular y la apoptosis indica que las acciones de BPA pueden ir más allá de la interferencia endocrina ¹⁹⁹. Nuestro estudio detecta resultados similares a los observados en células, en la clínica habitual, con resultados similares a la administración de dosis de BPA a las células estudiadas. El paciente en diálisis sufre los mismos cambios cuando se dializan con membranas de polisulfona.

Como se muestra en la figura 29 al estimular las PBMC's con BPA a diferentes concentraciones, que son las comprendidas entre las encontradas en los pacientes en el estudio, da lugar a un incremento de IL-6 y TNF α dosis-dependiente de BPA y es similar al incremento observado de estas citoquinas en presencia de las trazas de polisulfona que liberan BPA al medio (Figura 30). Por ese motivo pensamos que el BPA tiene un efecto directo sobre la inflamación y no es un marcador subrogado de otro posible factor no medido

Hemos observado también como la inflamación correlacionó con los cambios en las concentraciones de BPA en respuesta a los 2 tipos de membranas usadas en este estudio. El efecto pro-inflamatorio medido por IL-6 y PCR del BPA también pudo ser observado en cultivo de leucocitos, de manera similar a lo que observamos en los pacientes en hemodiálisis. Además, hemos visto como los dializadores con membranas de polisulfona, liberan BPA en el medio de cultivo celular. Esto confirma como el BPA es capaz de liberarse del dializador. La respuesta a la dosis proinflamatoria del BPA abarca la misma variación de valores de BPA en suero que encontramos en los pacientes en diálisis, por lo que los resultados pueden ser superponibles. En general, los hallazgos in vitro sugieren que el BPA contenido de dializadores puede afectar a la respuesta inflamatoria y al estrés oxidativo de los leucocitos circulantes en vivo. Un aumento de

todos estos marcadores dan lugar a complicaciones ya que estos mecanismos de defensa van a estar desregulados, ya no por la patología renal que puedan presentar sino también por la acumulación de BPA en el organismo. Por lo tanto demostramos que el BPA se desprende del material de la membrana del dializador con polisulfona, y es responsable en parte, de alterar los mecanismos de oxidación e inflamación, aumentando ambos. Esto es similar a otras toxinas urémicas como el p-cresol, que se conoce que tiene repercusión clínica.

El término toxina urémica lo acuñó Piorry en 1847 para indicar la "contaminación de la sangre con la orina" para referirse a los signos y síntomas derivados de la enfermedad renal que aumentan la mortalidad. Se propuso que una toxina urémica debería definirse como una molécula que cumpla con las siguientes premisas: 1) la identidad química y la concentración en los fluidos biológicos deben ser conocidos, 2) la concentración en individuos urémicos debe ser mayor que en los sujetos no urémicos y 3) la concentración debe correlacionar con los síntomas urémicos, y los síntomas deben desaparecer por la disminución de la concentración⁴⁹. Las toxinas urémicas son responsables de la enfermedad urémica. Entre los cambios que han sido directamente relacionados con las toxinas urémicas encontramos pérdida progresiva de la función renal, la morbilidad cardiovascular y síntomas urémicos tales como anorexia, vómitos, debilidad, trastornos del sueño, y la neuropatía. Una de las toxinas urémicas más estudiadas es el p-cresol que es un producto final de la degradación de las proteínas y un metabolito de aminoácidos de las bacterias intestinales^{200,201}. Dicha molécula es tóxica para pacientes urémicos. Algunos casos con intoxicaciones graves por p-cresol han sido descritos²⁰². Los fenoles e índoles han sido relacionados con múltiples alteraciones clínicas que presenta el paciente con ERC.

Existen grandes similitudes entre el BPA y algunas de las toxinas urémicas de origen fenólico como el p-cresol. Tanto el BPA como el p-cresol tras su metabolismo son eliminadas por la orina pero en estos pacientes se les acumula por lo que llegan a ser tóxicas por lo que sus concentraciones son mayores en pacientes urémicos que en sujetos sanos y esas concentraciones elevadas correlacionan con síntomas urémicos²⁰³. Como se ha comentado previamente de ambas moléculas, debido a sus propiedades físicas, se unen a proteínas transportadoras, lo que dificulta su eliminación por la membrana de diálisis. Este tipo de toxinas urémicas se clasifican como unidas a proteínas, habiéndose descrito 115 toxinas urémicas de este tipo en una revisión reciente²⁰⁴.

En definitiva, los pacientes en hemodiálisis tienen altos los niveles de BPA y la elección de la membrana de diálisis influye en los niveles de BPA tanto en suero como a nivel intracelular. Los dializadores con membranas que contienen BPA aumentan los niveles de BPA en suero para más de 3 meses y en una única sesión hemodiálisis. La falta de excreción de orina hace que aumenten los niveles de BPA, pero el uso de membranas de diálisis que contienen BPA incrementan más aún la concentración. A la vista de los resultados obtenidos en el presente trabajo y al ser cotidiano en las salas de diálisis el uso de estos dializadores con BPA, debería valorarse la posibilidad de sustituir o eliminar el BPA de los utensilios médicos, especialmente en los pacientes renales por la imposibilidad de eliminarlos por vía urinaria por lo que estamos de acuerdo con los resultados del comité de expertos de la Unión Europea que aconsejan eliminar el BPA de los utensilios médicos debido a efectos adversos vistos en estudios en humanos²⁰⁵.

En este sentido, encontramos evidencias de un aumento al estrés oxidativo y la inflamación en pacientes en hemodiálisis dializados con membranas de polisulfona, que

con el uso de membranas de polinefrona, libres de BPA. La eliminación de BPA en las diálisis podría mejorar el incremento de estos factores.

De los resultados de esta tesis se puede concluir que el BPA debe de ser considerado una toxina urémica de origen exógeno al cumplir todos los criterios de la definición de toxina urémica. Está elevado en el paciente renal y es responsable de un daño sistémico, como es la inflamación y la oxidación, y cuando se reduce cambiando la membrana del dializador estas alteraciones mejoran notablemente.

VII. CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

- 1) Los pacientes en hemodiálisis tienen niveles de BPA muy superiores en sangre que la población con función renal normal.
- 2) Las hemodiálisis con membranas de polisulfona incrementan los niveles de BPA sérico en una sola sesión de hemodiálisis mientras que los de polinefrona no se observan cambios
- 3) El uso durante tres meses de dializadores con membrana de polisulfona aumenta los niveles tanto en sangre como en células mononucleares de sangre periférica, mientras que en los pacientes dializados con dializadores con la membrana de polinefrona descienden.
- 4) Los pacientes dializados con membrana de polisulfona durante tres meses sufren un aumento de los marcadores de inflamación PCR y IL-6. Existiendo una correlación directa entre los marcadores de inflamación (IL-6 y PCR) con los valores de BPA sérico.
- 5) Los pacientes dializados con membrana de polisulfona durante tres meses sufren un aumento de la expresión de los niveles de ARNm involucrados en la respuesta antioxidante (Nrf2, HO-1, Catalasa, SOD-1 y NQO-1).
- 6) En células tubulares humanas, el BPA da lugar apoptosis y despolarización de la membrana y generación de ROS.

En resumen, estos resultados demuestran que el acumulo de BPA en el organismo al no poderse excretar por la orina, da lugar a un estado de inflamación crónica posiblemente como consecuencia del estrés oxidativo observado. Estos datos sugieren que el BPA cumple con los requisitos para ser considerado como una toxina urémica en pacientes

con insuficiencia renal y por lo que sería conveniente retirar el BPA de los componentes de los dializadores y de los recipientes de uso alimentario.

VIII. BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

1. McBride D, Dohan D, Handley MA, Powe NR, Tuot DS. Developing a CKD registry in primary care: provider attitudes and input. *Am J Kidney Dis.* 2014;63(4):577-583. doi:10.1053/j.ajkd.2013.10.012.
2. Levey AS, Atkins R, Coresh J, et al. Chronic kidney disease as a global public health problem: approaches and initiatives - a position statement from Kidney Disease Improving Global Outcomes. *Kidney Int.* 2007;72(3):247-259. doi:10.1038/sj.ki.5002343.
3. Muntner P, He J, Hamm L, Loria C, Whelton PK. Renal insufficiency and subsequent death resulting from cardiovascular disease in the United States. *J Am Soc Nephrol.* 2002;13(3):745-753. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11856780>. Accessed December 5, 2015.
4. Sarnak MJ, Levey AS, Schoolwerth AC, et al. Kidney disease as a risk factor for development of cardiovascular disease: a statement from the American Heart Association Councils on Kidney in Cardiovascular Disease, High Blood Pressure Research, Clinical Cardiology, and Epidemiology and Prevention. *Hypertension.* 2003;42(5):1050-1065. doi:10.1161/01.HYP.0000102971.85504.7c.
5. Alani H, Tamimi A, Tamimi N. Cardiovascular co-morbidity in chronic kidney disease: Current knowledge and future research needs. *World J Nephrol.* 2014;3(4):156-168. doi:10.5527/wjn.v3.i4.156.
6. Foley RN, Parfrey PS, Sarnak MJ. Epidemiology of cardiovascular disease in chronic renal disease. *J Am Soc Nephrol.* 1998;9(12 Suppl):S16-S23. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11443763>. Accessed December 1, 2015.
7. Foley RN, Wang C, Collins AJ. Cardiovascular risk factor profiles and kidney function stage in the US general population: the NHANES III study. *Mayo Clin Proc.* 2005;80(10):1270-1277. doi:10.4065/80.10.1270.
8. Shlipak MG, Fried LF, Cushman M, et al. Cardiovascular Mortality Risk in Chronic Kidney Disease. *JAMA.* 2005;293(14):1737. doi:10.1001/jama.293.14.1737.
9. Wetmore JB, Peng Y, Jackson S, Matlon TJ, Collins AJ, Gilbertson DT. Patient characteristics, disease burden, and medication use in stage 4 - 5 chronic kidney disease patients. *Clin Nephrol.* December 2015. doi:10.5414/CN108626.
10. Ghazan-Shahi S, Koh TJK, Chan CT. Impact of nocturnal hemodialysis on peripheral uremic neuropathy. *BMC Nephrol.* 2015;16:134. doi:10.1186/s12882-015-0133-2.
11. Degross F, Quaia E, Martingano P, Cavallaro M, Cova MA. Imaging of haemodialysis: renal and extrarenal findings. *Insights Imaging.* 2015;6(3):309-321. doi:10.1007/s13244-015-0383-3.

12. Amaresan MS, Geetha R. Early diagnosis of CKD and its prevention. *J Assoc Physicians India*. 2008;56:41-46. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18472500>. Accessed November 16, 2015.
13. Guijarro C, Egido J. Transcription factor-kappa B (NF-kappa B) and renal disease. *Kidney Int*. 2001;59(2):415-424. doi:10.1046/j.1523-1755.2001.059002415.x.
14. Davidson I, Gallieni M, Saxena R, Dolmatch B. A patient centered decision making dialysis access algorithm. *J Vasc Access*. 8(2):59-68. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17534790>. Accessed November 12, 2015.
15. Vgontzas AN, Bixler EO, Papanicolaou DA, Chrousos GP. Chronic systemic inflammation in overweight and obese adults. *JAMA*. 2000;283(17):2235; author reply 2236. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10807374>. Accessed October 25, 2015.
16. Stenvinkel P, Pecoits-Filho R, Lindholm B. Coronary artery disease in end-stage renal disease: no longer a simple plumbing problem. *J Am Soc Nephrol*. 2003;14(7):1927-1939. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12819254>. Accessed November 23, 2015.
17. Bemelmans MH, Gouma DJ, Buurman WA. Influence of nephrectomy on tumor necrosis factor clearance in a murine model. *J Immunol*. 1993;150(5):2007-2017. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8436831>. Accessed November 29, 2015.
18. Poole S, Bird TA, Selkirk S, et al. Fate of injected interleukin 1 in rats: sequestration and degradation in the kidney. *Cytokine*. 1990;2(6):416-422. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2104235>. Accessed November 29, 2015.
19. Cappelli G, Tetta C, Canaud B. Is biofilm a cause of silent chronic inflammation in haemodialysis patients? A fascinating working hypothesis. *Nephrol Dial Transplant*. 2005;20(2):266-270. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15647310>. Accessed November 29, 2015.
20. Pecoits-Filho R, Stenvinkel P, Wang AY-M, Heimbürger O, Lindholm B. Chronic inflammation in peritoneal dialysis: the search for the holy grail? *Perit Dial Int*. 24(4):327-339. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15335146>. Accessed November 29, 2015.
21. Yeun JY, Kaysen GA. Acute phase proteins and peritoneal dialysate albumin loss are the main determinants of serum albumin in peritoneal dialysis patients. *Am J Kidney Dis*. 1997;30(6):923-927. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9398142>. Accessed November 29, 2015.
22. Fein PA, Mittman N, Gadh R, et al. Malnutrition and inflammation in peritoneal dialysis patients. *Kidney Int Suppl*. 2003;(87):S87-S91. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14531779>. Accessed November 29, 2015.
23. Sato Y, Takatsu Y, Kataoka K, et al. Serial circulating concentrations of C-reactive protein, interleukin (IL)-4, and IL-6 in patients with acute left heart decompensation. *Clin Cardiol*. 1999;22(12):811-813. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10626084>. Accessed November 29, 2015.

24. Sharma R, Bolger AP, Li W, et al. Elevated circulating levels of inflammatory cytokines and bacterial endotoxin in adults with congenital heart disease. *Am J Cardiol.* 2003;92(2):188-193. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12860222>. Accessed November 29, 2015.
25. Hasper D, Hummel M, Kleber FX, Reindl I, Volk HD. Systemic inflammation in patients with heart failure. *Eur Heart J.* 1998;19(5):761-765. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9717010>. Accessed November 29, 2015.
26. Doherty TM, Asotra K, Fitzpatrick LA, et al. Calcification in atherosclerosis: bone biology and chronic inflammation at the arterial crossroads. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(20):11201-11206. doi:10.1073/pnas.1932554100.
27. Locatelli F, Canaud B, Eckardt K-U, Stenvinkel P, Wanner C, Zoccali C. The importance of diabetic nephropathy in current nephrological practice. *Nephrol Dial Transplant.* 2003;18(9):1716-1725. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12937216>. Accessed November 29, 2015.
28. Himmelfarb J, Stenvinkel P, Ikizler TA, Hakim RM. The elephant in uremia: Oxidant stress as a unifying concept of cardiovascular disease in uremia. *Kidney Int.* 2002;62(5):1524-1538. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12371953>. Accessed October 9, 2015.
29. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007;39(1):44-84. doi:10.1016/j.biocel.2006.07.001.
30. Valko M, Morris H, Mazúr M, Rapta P, Bilton RF. Oxygen free radical generating mechanisms in the colon: do the semiquinones of vitamin K play a role in the aetiology of colon cancer? *Biochim Biophys Acta.* 2001;1527(3):161-166. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11479033>. Accessed December 17, 2015.
31. Kovacic P, Jacintho JD. Mechanisms of carcinogenesis: focus on oxidative stress and electron transfer. *Curr Med Chem.* 2001;8(7):773-796. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11375749>. Accessed December 17, 2015.
32. Evans P, Halliwell B. Free radicals and hearing. Cause, consequence, and criteria. *Ann N Y Acad Sci.* 1999;884:19-40. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10842581>. Accessed December 17, 2015.
33. Kang DH, Kang SW. Targeting cellular antioxidant enzymes for treating atherosclerotic vascular disease. *Biomol Ther (Seoul).* 2013;21(2):89-96. doi:10.4062/biomolther.2013.015.
34. Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev.* 2002;82(1):47-95. doi:10.1152/physrev.00018.2001.
35. Inoue M, Sato EF, Nishikawa M, et al. Mitochondrial generation of reactive oxygen species and its role in aerobic life. *Curr Med Chem.* 2003;10(23):2495-2505. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14529465>. Accessed December 10, 2015.
36. Akiyama M, Hideshima T, Hayashi T, et al. Nuclear factor-kappaB p65 mediates

- tumor necrosis factor alpha-induced nuclear translocation of telomerase reverse transcriptase protein. *Cancer Res.* 2003;63(1):18-21. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12517770>. Accessed December 10, 2015.
37. Wang T, Zhang X, Li JJ. The role of NF-kappaB in the regulation of cell stress responses. *Int Immunopharmacol.* 2002;2(11):1509-1520. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12433052>. Accessed December 10, 2015.
 38. Held PJ, Port FK, Webb RL, et al. Excerpts from United States Renal Data System 1995 Annual Data Report. *Am J Kidney Dis.* 1995;26(4 Suppl 2):S1-S186. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7573030>. Accessed November 29, 2015.
 39. Scientific committee H and F safety. Opinion on The safety of the use of bisphenol A in medical devices. doi:10.2772/75546.
 40. Zimmermann J, Herrlinger S, Pruy A, Metzger T, Wanner C. Inflammation enhances cardiovascular risk and mortality in hemodialysis patients. *Kidney Int.* 1999;55(2):648-658. doi:10.1046/j.1523-1755.1999.00273.x.
 41. Bologa RM, Levine DM, Parker TS, et al. Interleukin-6 predicts hypoalbuminemia, hypocholesterolemia, and mortality in hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis.* 1998;32(1):107-114. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9669431>. Accessed November 1, 2015.
 42. Kimmel PL, Phillips TM, Simmens SJ, et al. Immunologic function and survival in hemodialysis patients. *Kidney Int.* 1998;54(1):236-244. doi:10.1046/j.1523-1755.1998.00981.x.
 43. Ward RA. Do clinical outcomes in chronic hemodialysis depend on the choice of a dialyzer? *Semin Dial.* 24(1):65-71. doi:10.1111/j.1525-139X.2010.00807.x.
 44. Ronco C, Brendolan A, Crepaldi C, Rodighiero M, Scabardi M. Blood and dialysate flow distributions in hollow-fiber hemodialyzers analyzed by computerized helical scanning technique. *J Am Soc Nephrol.* 2002;13 Suppl 1:S53-S61. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11792763>. Accessed November 29, 2015.
 45. Saito A. Definition of high-performance membranes - from the clinical point of view. *Contrib Nephrol.* 2011;173:1-10. doi:10.1159/000328938.
 46. Lorenzo V, Hernández D AJ. *Técnicas de Depuración Extrarrenal de La Sangre.* (Lorenzo V, Hernández D AJ, eds.). Elsevier
 47. Dzúrik R, Spustová V, Lajdová I. Inhibition of glucose utilization in isolated rat soleus muscle by pseudouridine: implications for renal failure. *Nephron.* 1993;65(1):108-110. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8413768>. Accessed November 17, 2015.
 48. Vanholder R, Van Landschoot N, De Smet R, Schoots A, Ringoir S. Drug protein binding in chronic renal failure: evaluation of nine drugs. *Kidney Int.* 1988;33(5):996-1004. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3392889>. Accessed November 17, 2015.

49. Zimmerman L, Bergström J, Jörnvall H. A method for separation of middle molecules by high performance liquid chromatography: application in studies of glucuronyl-o-hydroxyhippurate in normal and uremic subjects. *Clin Nephrol.* 1986;25(2):94-100. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3698350>. Accessed November 17, 2015.
50. Haag-Weber M, Mai B, Hörl WH. Impaired cellular host defence in peritoneal dialysis by two granulocyte inhibitory proteins. *Nephrol Dial Transplant.* 1994;9(12):1769-1773. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7708262>. Accessed November 17, 2015.
51. Kushner D, Beckman B, Nguyen L, et al. Polyamines in the anemia of end-stage renal disease. *Kidney Int.* 1991;39(4):725-732. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2051730>. Accessed November 17, 2015.
52. Niwa T, Aiuchi T, Nakaya K, Emoto Y, Miyazaki T, Maeda K. Inhibition of mitochondrial respiration by furancarboxylic acid accumulated in uremic serum in its albumin-bound and non-dialyzable form. *Clin Nephrol.* 1993;39(2):92-96. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8448924>. Accessed November 17, 2015.
53. Vallance P, Leone A, Calver A, Collier J, Moncada S. Accumulation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in chronic renal failure. *Lancet (London, England).* 1992;339(8793):572-575. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1347093>. Accessed November 17, 2015.
54. Costello JF, Sadovnic MJ, Cottington EM. Plasma oxalate levels rise in hemodialysis patients despite increased oxalate removal. *J Am Soc Nephrol.* 1991;1(12):1289-1298. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1912391>. Accessed November 17, 2015.
55. Dodds EC, Goldberg L, Lawson W, Robinson R. OEstrogenic Activity of Certain Synthetic Compounds : Abstract : Nature. <http://www.nature.com/nature/journal/v141/n3562/abs/141247b0.html>. Published February 1938. Accessed January 27, 2015.
56. Dodds EC, Goldberg L, Lawson W, Robinson R. OEstrogenic Activity of Certain Synthetic Compounds : Abstract : Nature.
57. Casajuana N, Lacorte S. New methodology for the determination of phthalate esters, bisphenol A, bisphenol A diglycidyl ether, and nonylphenol in commercial whole milk samples. *J Agric Food Chem.* 2004;52(12):3702-3707. doi:10.1021/jf040027s.
58. Thomson BM, Grounds PR. Bisphenol A in canned foods in New Zealand: an exposure assessment. *Food Addit Contam.* 2005;22(1):65-72.
59. Dekant W, Völkel W. Human exposure to bisphenol A by biomonitoring: methods, results and assessment of environmental exposures. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2008;228(1):114-134. doi:10.1016/j.taap.2007.12.008.
60. González-Parra E, Herrero JA, Elewa U, Bosch RJ, Arduán AO, Egido J. Bisphenol A in Chronic Kidney Disease. *Int J Nephrol.* 2013;2013:1-9. doi:10.1155/2013/437857.

61. Fda. DRAFT ASSESSMENT OF BISPHENOL A FOR USE IN Food Contact Applications.
62. Chepelev NL, Enikanolaiye MI, Chepelev LL, et al. Bisphenol A activates the Nrf1/2-antioxidant response element pathway in HEK 293 cells. *Chem Res Toxicol*. 2013;26(3):498-506. doi:10.1021/tx400036v.
63. Bosch-panadero E, Mas S, Sanchez-ospina D, Camarero V. The Choice of Hemodialysis Membrane Affects Serum Bisphenol A Levels. 2015:1-10. doi:10.1681/ASN.2015030312.
64. Wang K-H, Kao A-P, Chang C-C, Lin T-C, Kuo T-C. Bisphenol A-induced epithelial to mesenchymal transition is mediated by cyclooxygenase-2 up-regulation in human endometrial carcinoma cells. *Reprod Toxicol*. 2015;58:229-233. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26546977>. Accessed November 30, 2015.
65. Wang K-H, Kao A-P, Chang C-C, Lin T-C, Kuo T-C. Bisphenol A at environmentally relevant doses induces cyclooxygenase-2 expression and promotes invasion of human mesenchymal stem cells derived from uterine myoma tissue. *Taiwan J Obstet Gynecol*. 2013;52(2):246-252. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23915859>. Accessed December 3, 2015.
66. Khan S, Beigh S, Chaudhari BP, et al. Mitochondrial dysfunction induced by Bisphenol A is a factor of its hepatotoxicity in rats. *Environ Toxicol*. October 2015. doi:10.1002/tox.22193.
67. Lin Y, Sun X, Qiu L, et al. Exposure to bisphenol A induces dysfunction of insulin secretion and apoptosis through the damage of mitochondria in rat insulinoma (INS-1) cells. *Cell Death Dis*. 2013;4:e460. doi:10.1038/cddis.2012.206.
68. Nadal A, Ropero AB, Laribi O, Maillet M, Fuentes E, Soria B. Nongenomic actions of estrogens and xenoestrogens by binding at a plasma membrane receptor unrelated to estrogen receptor alpha and estrogen receptor beta. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(21):11603-11608. doi:10.1073/pnas.97.21.11603.
69. Quesada I, Fuentes E, Viso-León MC, Soria B, Ripoll C, Nadal A. Low doses of the endocrine disruptor bisphenol-A and the native hormone 17beta-estradiol rapidly activate transcription factor CREB. *FASEB J*. 2002;16(12):1671-1673. doi:10.1096/fj.02-0313fje.
70. Delfosse V, Grimaldi M, Pons J-L, et al. Structural and mechanistic insights into bisphenols action provide guidelines for risk assessment and discovery of bisphenol A substitutes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(37):14930-14935. doi:10.1073/pnas.1203574109.
71. le Maire A, Bourguet W, Balaguer P. A structural view of nuclear hormone receptor: endocrine disruptor interactions. *Cell Mol Life Sci*. 2010;67(8):1219-1237. doi:10.1007/s00018-009-0249-2.
72. Takayanagi S, Tokunaga T, Liu X, Okada H, Matsushima A, Shimohigashi Y. Endocrine disruptor bisphenol A strongly binds to human estrogen-related

- receptor gamma (ERRgamma) with high constitutive activity. *Toxicol Lett.* 2006;167(2):95-105. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17049190>. Accessed October 30, 2015.
73. Matsushima A, Kakuta Y, Teramoto T, et al. Structural evidence for endocrine disruptor bisphenol A binding to human nuclear receptor ERR gamma. *J Biochem.* 2007;142(4):517-524. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17761695>. Accessed October 30, 2015.
 74. Sui Y, Ai N, Park S-H, et al. Bisphenol A and its analogues activate human pregnane X receptor. *Environ Health Perspect.* 2012;120(3):399-405. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3295358&tool=pmc.ncbi&rendertype=abstract>. Accessed November 14, 2015.
 75. Sohoni P, Sumpter JP. Several environmental oestrogens are also anti-androgens. *J Endocrinol.* 1998;158(3):327-339. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9846162>. Accessed December 9, 2015.
 76. Riu A, Grimaldi M, le Maire A, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor γ is a target for halogenated analogs of bisphenol A. *Environ Health Perspect.* 2011;119(9):1227-1232. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3230400&tool=pmc.ncbi&rendertype=abstract>. Accessed December 9, 2015.
 77. Moriyama K, Tagami T, Akamizu T, et al. Thyroid Hormone Action Is Disrupted by Bisphenol A as an Antagonist. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002;87(11):5185-5190. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12414890>. Accessed October 18, 2015.
 78. Zoeller RT, Bansal R, Parris C. Bisphenol-A, an environmental contaminant that acts as a thyroid hormone receptor antagonist in vitro, increases serum thyroxine, and alters RC3/neurogranin expression in the developing rat brain. *Endocrinology.* 2005;146(2):607-612. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15498886>. Accessed November 29, 2015.
 79. Welshons W V, Nagel SC, vom Saal FS. Large effects from small exposures. III. Endocrine mechanisms mediating effects of bisphenol A at levels of human exposure. *Endocrinology.* 2006;147(6 Suppl):S56-S69. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16690810>. Accessed November 23, 2015.
 80. Alonso-Magdalena P, Ropero AB, Soriano S, et al. Bisphenol-A acts as a potent estrogen via non-classical estrogen triggered pathways. *Mol Cell Endocrinol.* 2012;355(2):201-207. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22227557>. Accessed December 15, 2015.
 81. Wang T, Lu J, Xu M, et al. Urinary bisphenol a concentration and thyroid function in Chinese adults. *Epidemiology.* 2013;24(2):295-302. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23337242>. Accessed November 13, 2015.
 82. Sun H, Xu L-C, Chen J-F, Song L, Wang X-R. Effect of bisphenol A, tetrachlorobisphenol A and pentachlorophenol on the transcriptional activities of androgen receptor-mediated reporter gene. *Food Chem Toxicol.* 2006;44(11):1916-1921. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16893599>.

Accessed October 8, 2015.

83. Leranath C, Hajszan T, Szigeti-Buck K, Bober J, MacLusky NJ. Bisphenol A prevents the synaptogenic response to estradiol in hippocampus and prefrontal cortex of ovariectomized nonhuman primates. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(37):14187-14191. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2544599&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Accessed December 14, 2015.
84. Yang Y-J, Lee S-Y, Kim K-Y, Hong Y-P. Acute testis toxicity of bisphenol A diglycidyl ether in Sprague-Dawley rats. *J Prev Med Public Health*. 2010;43(2):131-137. doi:10.3961/jpmph.2010.43.2.131.
85. Nagel SC, vom Saal FS, Thayer KA, Dhar MG, Boechler M, Welshons W V. Relative binding affinity-serum modified access (RBA-SMA) assay predicts the relative in vivo bioactivity of the xenoestrogens bisphenol A and octylphenol. *Environ Health Perspect*. 1997;105(1):70-76.
86. Timms BG, Howdeshell KL, Barton L, Bradley S, Richter CA, vom Saal FS. Estrogenic chemicals in plastic and oral contraceptives disrupt development of the fetal mouse prostate and urethra. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(19):7014-7019. doi:10.1073/pnas.0502544102.
87. Prins GS, Tang W-Y, Belmonte J, Ho S-M. Developmental exposure to bisphenol A increases prostate cancer susceptibility in adult rats: epigenetic mode of action is implicated. *Fertil Steril*. 2008;89(2 Suppl):e41. doi:10.1016/j.fertnstert.2007.12.023.
88. Salian S, Doshi T, Vanage G. Perinatal exposure of rats to Bisphenol A affects fertility of male offspring--an overview. *Reprod Toxicol*. 2011;31(3):359-362. doi:10.1016/j.reprotox.2010.10.008.
89. Kim ME, Park HR, Gong EJ, Choi SY, Kim HS, Lee J. Exposure to bisphenol A appears to impair hippocampal neurogenesis and spatial learning and memory. *Food Chem Toxicol An Int J Publ Br Ind Biol Res Assoc*. 2011;49(12):3383-3389. doi:10.1016/j.fct.2011.09.017.
90. Gonçalves CR, Cunha RW, Barros DM, Martínez PE. Effects of prenatal and postnatal exposure to a low dose of bisphenol A on behavior and memory in rats. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2010;30(2):195-201. doi:10.1016/j.etap.2010.06.003.
91. Xu X, Tian D, Hong X, Chen L, Xie L. Sex-specific influence of exposure to bisphenol-A between adolescence and young adulthood on mouse behaviors. *Neuropharmacology*. 2011;61(4):565-573. doi:10.1016/j.neuropharm.2011.04.027.
92. Patisaul HB, Polston EK. Influence of endocrine active compounds on the developing rodent brain. *Brain Res Rev*. 2008;57(2):352-362. doi:10.1016/j.brainresrev.2007.06.008.
93. Rubin BS, Soto AM. Bisphenol A: Perinatal exposure and body weight. *Mol Cell Endocrinol*. 2009;304(1-2):55-62. doi:10.1016/j.mce.2009.02.023.

94. Somm E, Schwitzgebel VM, Toulotte A, et al. Perinatal exposure to bisphenol a alters early adipogenesis in the rat. *Environ Health Perspect.* 2009;117(10):1549-1555. doi:10.1289/ehp.11342.
95. Castro B, Sánchez P, Torres JM, Preda O, del Moral RG, Ortega E. Bisphenol A exposure during adulthood alters expression of aromatase and 5 α -reductase isozymes in rat prostate. *PLoS One.* 2013;8(2):e55905. doi:10.1371/journal.pone.0055905.
96. Lemos MFL, van Gestel CAM, Soares AMVM. Developmental toxicity of endocrine disrupters bisphenol A and vinclozolin in a terrestrial isopod. *Arch Environ Contam Toxicol.* 2010;59(2):274-281. doi:10.1007/s00244-010-9474-9.
97. Ropero AB, Alonso-Magdalena P, García-García E, Ripoll C, Fuentes E, Nadal A. Bisphenol-A disruption of the endocrine pancreas and blood glucose homeostasis. *Int J Androl.* 2008;31(2):194-200. doi:10.1111/j.1365-2605.2007.00832.x.
98. Richter CA, Birnbaum LS, Farabollini F, et al. In vivo effects of bisphenol A in laboratory rodent studies. *Reprod Toxicol.* 24(2):199-224. doi:10.1016/j.reprotox.2007.06.004.
99. Bindhumol V, Chitra KC, Mathur PP. Bisphenol A induces reactive oxygen species generation in the liver of male rats. *Toxicology.* 2003;188(2-3):117-124.
100. Zhu H, Xiao X, Zheng J, Zheng S, Dong K, Yu Y. Growth-promoting effect of bisphenol A on neuroblastoma in vitro and in vivo. *J Pediatr Surg.* 2009;44(4):672-680. doi:10.1016/j.jpedsurg.2008.10.067.
101. Braun JM, Yolton K, Dietrich KN, et al. Prenatal bisphenol A exposure and early childhood behavior. *Environ Health Perspect.* 2009;117(12):1945-1952. doi:10.1289/ehp.0900979.
102. Vasiliu O, Cameron L, Gardiner J, DeGuire P, Karmaus W. Polybrominated Biphenyls, Polychlorinated Biphenyls, Body Weight, and Incidence of Adult-Onset Diabetes Mellitus. *Epidemiology.* 2006;17(4):352-359. doi:10.1097/01.ede.0000220553.84350.c5.
103. Lang IA, Galloway TS, Scarlett A, et al. Association of urinary bisphenol A concentration with medical disorders and laboratory abnormalities in adults. *JAMA.* 2008;300(11):1303-1310. doi:10.1001/jama.300.11.1303.
104. Yang YJ, Hong Y-C, Oh S-Y, et al. Bisphenol A exposure is associated with oxidative stress and inflammation in postmenopausal women. *Environ Res.* 2009;109(6):797-801. doi:10.1016/j.envres.2009.04.014.
105. Hugo ER, Brandebourg TD, Woo JG, Loftus J, Alexander JW, Ben-Jonathan N. Bisphenol A at environmentally relevant doses inhibits adiponectin release from human adipose tissue explants and adipocytes. *Environ Health Perspect.* 2008;116(12):1642-1647. doi:10.1289/ehp.11537.
106. Yan S, Chen Y, Dong M, Song W, Belcher SM, Wang H-S. Bisphenol A and 17 β -estradiol promote arrhythmia in the female heart via alteration of calcium handling. *PLoS One.* 2011;6(9):e25455. doi:10.1371/journal.pone.0025455.

107. Melzer D, Osborne NJ, Henley WE, et al. Urinary bisphenol A concentration and risk of future coronary artery disease in apparently healthy men and women. *Circulation*. 2012;125(12):1482-1490. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.111.069153.
108. Shankar A, Teppala S. Urinary bisphenol A and hypertension in a multiethnic sample of US adults. *J Environ Public Health*. 2012;2012:481641. doi:10.1155/2012/481641.
109. Vandenberg LN, Chahoud I, Padmanabhan V, Paumgarten FJR, Schoenfelder G. Biomonitoring studies should be used by regulatory agencies to assess human exposure levels and safety of bisphenol A. *Environ Health Perspect*. 2010;118(8):1051-1054. doi:10.1289/ehp.0901717.
110. You L, Zhu X, Shrubsole MJ, et al. Renal function, bisphenol A, and alkylphenols: results from the National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES 2003-2006). *Environ Health Perspect*. 2011;119(4):527-533. doi:10.1289/ehp.1002572.
111. Trasande L, Attina TM, Trachtman H. Bisphenol A exposure is associated with low-grade urinary albumin excretion in children of the United States. *Kidney Int*. 2013;83(4):741-748. doi:10.1038/ki.2012.422.
112. Li M, Bi Y, Qi L, et al. Exposure to bisphenol A is associated with low-grade albuminuria in Chinese adults. *Kidney Int*. 2012;81(11):1131-1139. doi:10.1038/ki.2012.6.
113. Olea-Herrero N, Arenas MI, Muñóz-Moreno C, et al. Bisphenol-A induces podocytopathy with proteinuria in mice. *J Cell Physiol*. 2014;229(12):2057-2066. doi:10.1002/jcp.24665.
114. Saura M, Marquez S, Reventun P, et al. Oral administration of bisphenol A induces high blood pressure through angiotensin II/CaMKII-dependent uncoupling of eNOS. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol*. 2014;28(11):4719-4728. doi:10.1096/fj.14-252460.
115. Hu J, Yang S, Wang Y, et al. Serum bisphenol A and progression of type 2 diabetic nephropathy: a 6-year prospective study. *Acta Diabetol*. September 2015. doi:10.1007/s00592-015-0801-5.
116. Romero M, Ortega A, Izquierdo A, López-Luna P, Bosch RJ. Parathyroid hormone-related protein induces hypertrophy in podocytes via TGF-beta(1) and p27(Kip1): implications for diabetic nephropathy. *Nephrol Dial Transplant*. 2010;25(8):2447-2457. doi:10.1093/ndt/gfq104.
117. Iglesias-de la Cruz MC, Ziyadeh FN, Isono M, et al. Effects of high glucose and TGF-beta1 on the expression of collagen IV and vascular endothelial growth factor in mouse podocytes. *Kidney Int*. 2002;62(3):901-913. doi:10.1046/j.1523-1755.2002.00528.x.
118. Wolf G, Ziyadeh FN. Molecular mechanisms of diabetic renal hypertrophy. *Kidney Int*. 1999;56(2):393-405. doi:10.1046/j.1523-1755.1999.00590.x.
119. Boeniger MF, Lowry LK, Rosenberg J. Interpretation of urine results used to

- assess chemical exposure with emphasis on creatinine adjustments: a review. *Am Ind Hyg Assoc J*. 1993;54(10):615-627. doi:10.1080/15298669391355134.
120. Hengstler JG, Foth H, Gebel T, et al. Critical evaluation of key evidence on the human health hazards of exposure to bisphenol A. *Crit Rev Toxicol*. 2011;41(4):263-291. doi:10.3109/10408444.2011.558487.
 121. Murakami K, Ohashi A, Hori H, et al. Accumulation of bisphenol A in hemodialysis patients. *Blood Purif*. 2007;25(3):290-294. doi:10.1159/000104869.
 122. Krieter DH, Canaud B, Lemke H-D, et al. Bisphenol A in chronic kidney disease. *Artif Organs*. 2013;37(3):283-290. doi:10.1111/j.1525-1594.2012.01556.x.
 123. Haishima Y, Hayashi Y, Yagami T, Nakamura A. Elution of bisphenol-A from hemodialyzers consisting of polycarbonate and polysulfone resins. *J Biomed Mater Res*. 2001;58(2):209-215.
 124. Shintani H. Determination of the endocrine disrupter bisphenol-A in the blood of uremia patients treated by dialysis. *Chromatographia*. 2001;(53):331-333.
 125. Yamasaki H, Nagake Y, Makino H. Determination of bisphenol a in effluents of hemodialyzers. *Nephron*. 2001;88(4):376-378. doi:46023.
 126. Sugimura K, Naganuma T, Kakiya Y, Okada C, Sugimura T, Kishimoto T. Endocrine-disrupting chemicals in CAPD dialysate and effluent. *Blood Purif*. 2001;19(1):21-23.
 127. Calafat AM, Kuklenyik Z, Reidy JA, Caudill SP, Ekong J, Needham LL. Urinary concentrations of bisphenol A and 4-nonylphenol in a human reference population. *Environ Health Perspect*. 2005;113(4):391-395. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1278476&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Accessed November 18, 2015.
 128. Vandenberg LN, Chahoud I, Heindel JJ, Padmanabhan V, Paumgartten FJR, Schoenfelder G. Urinary, circulating, and tissue biomonitoring studies indicate widespread exposure to bisphenol A. *Ciência & saúde coletiva*. 2012;17(2):407-434. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22267036>. Accessed January 5, 2016.
 129. Xin F, Jiang L, Liu X, et al. Bisphenol A induces oxidative stress-associated DNA damage in INS-1 cells. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*. 2014;769:29-33. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25344109>. Accessed November 12, 2015.
 130. Huang F-M, Li Y-C, Lee S-S, Chang Y-C. Cytotoxicity of dentine bonding agents on human pulp cells is related to intracellular glutathione levels. *Int Endod J*. 2010;43(12):1091-1097. doi:10.1111/j.1365-2591.2010.01779.x.
 131. Sangai NP, Verma RJ, Trivedi MH. Testing the efficacy of quercetin in mitigating bisphenol A toxicity in liver and kidney of mice. *Toxicol Ind Health*. 2014;30(7):581-597. doi:10.1177/0748233712457438.
 132. Kabuto H, Hasuike S, Minagawa N, Shishibori T. Effects of bisphenol A on the metabolisms of active oxygen species in mouse tissues. *Environ Res*. 2003;93(1):31-35. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12865045>. Accessed

December 22, 2015.

133. Mokra K, Kocia M, Michałowicz J. Bisphenol A and its analogs exhibit different apoptotic potential in peripheral blood mononuclear cells (in vitro study). *Food Chem Toxicol.* 2015;84:79-88. doi:10.1016/j.fct.2015.08.007.
134. Savastano S, Tarantino G, D'Esposito V, et al. Bisphenol-A plasma levels are related to inflammatory markers, visceral obesity and insulin-resistance: a cross-sectional study on adult male population. *J Transl Med.* 2015;13:169. doi:10.1186/s12967-015-0532-y.
135. Wens B, De Boever P, Verbeke M, Hollanders K, Schoeters G. Cultured human peripheral blood mononuclear cells alter their gene expression when challenged with endocrine-disrupting chemicals. *Toxicology.* 2013;303:17-24. doi:10.1016/j.tox.2012.10.019.
136. Zhu J, Jiang L, Liu Y, et al. MAPK and NF- κ B pathways are involved in bisphenol A-induced TNF- α and IL-6 production in BV2 microglial cells. *Inflammation.* 2015;38(2):637-648. doi:10.1007/s10753-014-9971-5.
137. Mattiasson G. Flow cytometric analysis of isolated liver mitochondria to detect changes relevant to cell death. *Cytometry A.* 2004;60(2):145-154. doi:10.1002/cyto.a.20024.
138. Cossarizza A, Ceccarelli D, Masini A. Functional heterogeneity of an isolated mitochondrial population revealed by cytofluorometric analysis at the single organelle level. *Exp Cell Res.* 1996;222(1):84-94. doi:10.1006/excr.1996.0011.
139. Petit PX, O'Connor JE, Grunwald D, Brown SC. Analysis of the membrane potential of rat- and mouse-liver mitochondria by flow cytometry and possible applications. *Eur J Biochem.* 1990;194(2):389-397. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2269275>. Accessed January 5, 2016.
140. Lopez-Mediavilla C, Orfao A, Gonzalez M, Medina JM. Identification by flow cytometry of two distinct rhodamine-123-stained mitochondrial populations in rat liver. *FEBS Lett.* 1989;254(1-2):115-120. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2476332>. Accessed January 5, 2016.
141. Umegaki T, Okimura Y, Fujita H, et al. Flow cytometric analysis of ca-induced membrane permeability transition of isolated rat liver mitochondria. *J Clin Biochem Nutr.* 2008;42:35-44. doi:10.3164/jcbn.2008006.
142. Lecoeur H, Langonné A, Baux L, et al. Real-time flow cytometry analysis of permeability transition in isolated mitochondria. *Exp Cell Res.* 2004;294(1):106-117. doi:10.1016/j.yexcr.2003.10.030.
143. Poot M, Pierce RH. Detection of changes in mitochondrial function during apoptosis by simultaneous staining with multiple fluorescent dyes and correlated multiparameter flow cytometry. *Cytometry.* 1999;35(4):311-317. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10213196>. Accessed January 5, 2016.
144. Hammes F, Egli T. Cytometric methods for measuring bacteria in water: advantages, pitfalls and applications. *Anal Bioanal Chem.* 2010;397(3):1083-1095. doi:10.1007/s00216-010-3646-3.

145. Otero A, de Francisco A, Gayoso P, García F. Prevalence of chronic renal disease in Spain: results of the EPIRCE study. *Nefrologia*. 2010;30(1):78-86. doi:10.3265/Nefrologia.pre2009.Dic.5732.
146. Rezg R, El-Fazaa S, Gharbi N, Mornagui B. Bisphenol A and human chronic diseases: current evidences, possible mechanisms, and future perspectives. *Environ Int*. 2014;64:83-90. doi:10.1016/j.envint.2013.12.007.
147. Bolt HM, Janning P, Michna H, Degen GH. Comparative assessment of endocrine modulators with oestrogenic activity: I. Definition of a hygiene-based margin of safety (HBMOS) for xeno-oestrogens against the background of European developments. *Arch Toxicol*. 2001;74(11):649-662. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11218041>. Accessed December 21, 2015.
148. González-Casado A, Navas N, del Olmo M, Vílchez JL. Determination of bisphenol A in water by micro liquid-liquid extraction followed by silylation and gas chromatography-mass spectrometry analysis. *J Chromatogr Sci*. 1998;36(11):565-569. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9812391>. Accessed November 18, 2015.
149. Huang YQ, Wong CKC, Zheng JS, et al. Bisphenol A (BPA) in China: a review of sources, environmental levels, and potential human health impacts. *Environ Int*. 2012;42:91-99. doi:10.1016/j.envint.2011.04.010.
150. Yoo SD, Shin BS, Kwack SJ, et al. Pharmacokinetic disposition and tissue distribution of bisphenol A in rats after intravenous administration. *J Toxicol Environ Health A*. 2000;61(2):131-139. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11032426>. Accessed March 29, 2016.
151. Calafat AM, Kuklenyik Z, Reidy JA, Caudill SP, Ekong J, Needham LL. Urinary concentrations of bisphenol A and 4-nonylphenol in a human reference population. *Environ Health Perspect*. 2005;113(4):391-395. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1278476&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Accessed November 18, 2015.
152. Watanabe T, Yamamoto H, Inoue K, et al. Development of sensitive high-performance liquid chromatography with fluorescence detection using 4-(4,5-diphenyl-1H-imidazol-2-yl)-benzoyl chloride as a labeling reagent for determination of bisphenol A in plasma samples. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*. 2001;762(1):1-7. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11589452>.
153. vom Saal FS, Myers JP. Bisphenol A and risk of metabolic disorders. *JAMA*. 2008;300(11):1353-1355. doi:10.1001/jama.300.11.1353.
154. Alonso-Magdalena P, García-Arévalo M, Quesada I, Nadal Á. Bisphenol-A treatment during pregnancy in mice: a new window of susceptibility for the development of diabetes in mothers later in life. *Endocrinology*. 2015;156(5):1659-1670. doi:10.1210/en.2014-1952.
155. Li D-K, Zhou Z, Miao M, et al. Urine bisphenol-A (BPA) level in relation to semen quality. *Fertil Steril*. 2011;95(2):625-630.e4. doi:10.1016/j.fertnstert.2010.09.026.

156. Meeker JD, Calafat AM, Hauser R. Urinary bisphenol A concentrations in relation to serum thyroid and reproductive hormone levels in men from an infertility clinic. *Environ Sci Technol.* 2010;44(4):1458-1463. doi:10.1021/es9028292.
157. Kataria A, Trasande L, Trachtman H. The effects of environmental chemicals on renal function. *Nat Rev Nephrol.* 2015;11(10):610-625. doi:10.1038/nrneph.2015.94.
158. Cutanda F, Koch HM, Esteban M, Sánchez J, Angerer J, Castaño A. Urinary levels of eight phthalate metabolites and bisphenol A in mother-child pairs from two Spanish locations. *Int J Hyg Environ Health.* 2015;218(1):47-57. doi:10.1016/j.ijheh.2014.07.005.
159. Krieter DH, Canaud B, Lemke H-D, et al. Bisphenol A in chronic kidney disease. *Artif Organs.* 2013;37(3):283-290. doi:10.1111/j.1525-1594.2012.01556.x.
160. Kanno Y, Okada H, Kobayashi T, Takenaka T, Suzuki H. Effects of endocrine disrupting substance on estrogen receptor gene transcription in dialysis patients. *Ther Apher Dial.* 2007;11(4):262-265. doi:10.1111/j.1744-9987.2007.00472.x.
161. Yalcin EB, Kulkarni SR, Slitt AL, King R. Bisphenol a sulfonation is impaired in metabolic and liver disease. *Toxicol Appl Pharmacol.* December 2015. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26712468>. Accessed December 31, 2015.
162. Dimastrogiovanni G, Córdoba M, Navarro I, Jáuregui O, Porte C. Alteration of cellular lipids and lipid metabolism markers in RTL-W1 cells exposed to model endocrine disrupters. *Aquat Toxicol.* 2015;165:277-285. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26143618>. Accessed November 20, 2015.
163. Benigni A, Zoja C, Tomasoni S, et al. Transcriptional regulation of nephrin gene by peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist: molecular mechanism of the antiproteinuric effect of pioglitazone. *J Am Soc Nephrol.* 2006;17(6):1624-1632. doi:10.1681/ASN.2005090983.
164. Jurgella GF, Marwah A, Malison JA, Peterson R, Barry TP. Effects of xenobiotics and steroids on renal and hepatic estrogen metabolism in lake trout. *Gen Comp Endocrinol.* 2006;148(2):273-281. doi:10.1016/j.ygcen.2006.03.011.
165. Pelis RM, Hartman RC, Wright SH, Wunz TM, Groves CE. Influence of estrogen and xenoestrogens on basolateral uptake of tetraethylammonium by opossum kidney cells in culture. *J Pharmacol Exp Ther.* 2007;323(2):555-561. doi:10.1124/jpet.107.126748.
166. Tarapore P, Ying J, Ouyang B, Burke B, Bracken B, Ho S-M. Exposure to bisphenol A correlates with early-onset prostate cancer and promotes centrosome amplification and anchorage-independent growth in vitro. *PLoS One.* 2014;9(3):e90332. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3940879&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Accessed December 23, 2015.
167. Maduell F. [Convection versus diffusion: Is it time to make a change?]. *Nefrol publicación Of la Soc Española Nefrol.* 2009;29(6):589-593.

doi:10.3265/Nefrologia.2009.29.6.5665.en.full.

168. Ogunro PS, Olujombo FA, Ajala MO, Oshodi TT. The effect of a membrane dialyzer during hemodialysis on the antioxidant status and lipid peroxidation of patients with end-stage renal disease. *Saudi J Kidney Dis Transpl.* 2014;25(6):1186-1193. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25394434>. Accessed December 31, 2015.
169. Ramakrishna P, Reddy EP, Suchitra MM, Bitla AR, Rao PVS, Sivakumar V. Effect of reuse of polysulfone membrane on oxidative stress during hemodialysis. *Indian J Nephrol.* 2012;22(3):200-205. doi:10.4103/0971-4065.98758.
170. Yavuz A, Tetta C, Ersoy FF, et al. Uremic toxins: a new focus on an old subject. *Semin Dial.* 18(3):203-211. doi:10.1111/j.1525-139X.2005.18313.x.
171. Susantitaphong P, Riella C, Jaber BL. Effect of ultrapure dialysate on markers of inflammation, oxidative stress, nutrition and anemia parameters: a meta-analysis. *Nephrol Dial Transplant.* 2013;28(2):438-446. doi:10.1093/ndt/gfs514.
172. Csanády GA, Oberste-Frielinghaus HR, Semder B, Baur C, Schneider KT, Filser JG. Distribution and unspecific protein binding of the xenoestrogens bisphenol A and daidzein. *Arch Toxicol.* 2002;76(5-6):299-305. doi:10.1007/s00204-002-0339-5.
173. Stenvinkel P, Ketteler M, Johnson RJ, et al. IL-10, IL-6, and TNF-alpha: Central factors in the altered cytokine network of uremia-The good, the bad, and the ugly. *Kidney Int.* 2005;67(4):1216-1233. doi:10.1111/j.1523-1755.2005.00200.x.
174. Chertow GM, Soroko SH, Paganini EP, et al. Mortality after acute renal failure: models for prognostic stratification and risk adjustment. *Kidney Int.* 2006;70(6):1120-1126. doi:10.1038/sj.ki.5001579.
175. Schindler R. Causes and therapy of microinflammation in renal failure. *Nephrol Dial Transplant.* 2004;19 Suppl 5:V34-V40. doi:10.1093/ndt/gfh1054.
176. Chepelev NL, Enikanolaiye MI, Chepelev LL, et al. Bisphenol A activates the Nrf1/2-antioxidant response element pathway in HEK 293 cells. *Chem Res Toxicol.* 2013;26(3):498-506. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23360430>. Accessed November 12, 2015.
177. Jiang Y, Liu J, Li Y, et al. Prenatal exposure to bisphenol A at the reference dose impairs mitochondria in the heart of neonatal rats. *J Appl Toxicol JAT.* 2014;34(9):1012-1022. doi:10.1002/jat.2924.
178. Xia W, Jiang Y, Li Y, et al. Early-life exposure to bisphenol a induces liver injury in rats involvement of mitochondria-mediated apoptosis. *PLoS One.* 2014;9(2):e90443. doi:10.1371/journal.pone.0090443.
179. Tucker PS, Scanlan AT, Dalbo VJ. Chronic kidney disease influences multiple systems: describing the relationship between oxidative stress, inflammation, kidney damage, and concomitant disease. *Oxid Med Cell Longev.* 2015;2015:806358. doi:10.1155/2015/806358.
180. Lucchi L, Banni S, Botti B, et al. Conjugated diene fatty acids in patients with

- chronic renal failure: evidence of increased lipid peroxidation? *Nephron*. 1993;65(3):401-409. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8289990>. Accessed December 31, 2015.
181. Quiroga B, Villaverde M, Abad S, Vega A, Reque J, López-Gómez JM. Diastolic dysfunction and high levels of new cardiac biomarkers as risk factors for cardiovascular events and mortality in hemodialysis patients. *Blood Purif*. 2013;36(2):98-106. doi:10.1159/000354080.
 182. Ooe H, Taira T, Iguchi-Ariga SMM, Ariga H. Induction of reactive oxygen species by bisphenol A and abrogation of bisphenol A-induced cell injury by DJ-1. *Toxicol Sci*. 2005;88(1):114-126. doi:10.1093/toxsci/kfi278.
 183. Fang C, Ning B, Waqar AB, et al. Bisphenol A exposure enhances atherosclerosis in WHHL rabbits. *PLoS One*. 2014;9(10):e110977. doi:10.1371/journal.pone.0110977.
 184. Watkins DJ, Ferguson KK, Anzalota Del Toro L V., Alshawabkeh AN, Cordero JF, Meeker JD. Associations between urinary phenol and paraben concentrations and markers of oxidative stress and inflammation among pregnant women in Puerto Rico. *Int J Hyg Environ Health*. November 2014. doi:10.1016/j.ijheh.2014.11.001.
 185. Kabuto H, Amakawa M, Shishibori T. Exposure to bisphenol A during embryonic/fetal life and infancy increases oxidative injury and causes underdevelopment of the brain and testis in mice. *Life Sci*. 2004;74(24):2931-2940. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15051418>. Accessed October 30, 2015.
 186. Kabuto H, Hasuike S, Minagawa N, Shishibori T. Effects of bisphenol A on the metabolisms of active oxygen species in mouse tissues. *Environ Res*. 2003;93(1):31-35. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12865045>. Accessed December 22, 2015.
 187. Locatelli F, Canaud B, Eckardt K-U, Stenvinkel P, Wanner C, Zoccali C. The importance of diabetic nephropathy in current nephrological practice. *Nephrol Dial Transplant*. 2003;18(9):1716-1725. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12937216>. Accessed November 29, 2015.
 188. Handelman GJ. Current studies on oxidant stress in dialysis. *Blood Purif*. 2003;21(1):46-50. doi:67868.
 189. Jackson P, Loughrey CM, Lightbody JH, McNamee PT, Young IS. Effect of hemodialysis on total antioxidant capacity and serum antioxidants in patients with chronic renal failure. *Clin Chem*. 1995;41(8 Pt 1):1135-1138. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7628087>. Accessed December 31, 2015.
 190. Daschner M, Lenhartz H, Böttcher D, et al. Influence of dialysis on plasma lipid peroxidation products and antioxidant levels. *Kidney Int*. 1996;50(4):1268-1272. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8887287>. Accessed December 31, 2015.
 191. Slater TF. Free-radical mechanisms in tissue injury. *Biochem J*. 1984;222(1):1-15.

- <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1144137&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Accessed December 31, 2015.
192. Pompella A, Visvikis A, Paolicchi A, De Tata V, Casini AF. The changing faces of glutathione, a cellular protagonist. *Biochem Pharmacol.* 2003;66(8):1499-1503. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14555227>. Accessed October 15, 2015.
 193. Zoeller RT, Bansal R, Parris C. Bisphenol-A, an environmental contaminant that acts as a thyroid hormone receptor antagonist in vitro, increases serum thyroxine, and alters RC3/neurogranin expression in the developing rat brain. *Endocrinology.* 2005;146(2):607-612. doi:10.1210/en.2004-1018.
 194. Ropero AB, Alonso-Magdalena P, García-García E, Ripoll C, Fuentes E, Nadal A. Bisphenol-A disruption of the endocrine pancreas and blood glucose homeostasis. *Int J Androl.* 2008;31(2):194-200. doi:10.1111/j.1365-2605.2007.00832.x.
 195. Kafi MA, Kim T-H, An JH, Choi J-W. Electrochemical cell-based chip for the detection of toxic effects of bisphenol-A on neuroblastoma cells. *Biosens Bioelectron.* 2011;26(7):3371-3375. doi:10.1016/j.bios.2010.12.030.
 196. Lin Y, Zeng X, Wu D, Wang X. [Study on bisphenol A induced primary cultured mesencephalic neuronal cell injury by oxidative stress]. *Wei Sheng Yan Jiu.* 2006;35(4):419-422. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16986513>. Accessed December 31, 2015.
 197. Urcan E, Scherthan H, Styliou M, Haertel U, Hickel R, Reichl F-X. Induction of DNA double-strand breaks in primary gingival fibroblasts by exposure to dental resin composites. *Biomaterials.* 2010;31(8):2010-2014. doi:10.1016/j.biomaterials.2009.11.065.
 198. Chang M-C, Chen L-I, Chan C-P, et al. The role of reactive oxygen species and hemeoxygenase-1 expression in the cytotoxicity, cell cycle alteration and apoptosis of dental pulp cells induced by BisGMA. *Biomaterials.* 2010;31(32):8164-8171. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20673999>. Accessed December 31, 2015.
 199. Bontempo P, Mita L, Doto A, et al. Molecular analysis of the apoptotic effects of BPA in acute myeloid leukemia cells. *J Transl Med.* 2009;7:48. doi:10.1186/1479-5876-7-48.
 200. Geypens B, Claus D, Evenepoel P, et al. Influence of dietary protein supplements on the formation of bacterial metabolites in the colon. *Gut.* 1997;41(1):70-76. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1027231&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Accessed December 22, 2015.
 201. Curtius HC, Mettler M, Ettlinger L. Study of the intestinal tyrosine metabolism using stable isotopes and gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr.* 1976;126:569-580. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/977696>. Accessed December 22, 2015.
 202. Kamijo Y, Soma K, Kokuto M, Ohbu M, Fuke C, Ohwada T. Hepatocellular

- injury with hyperaminotransferasemia after cresol ingestion. *Arch Pathol Lab Med.* 2003;127(3):364-366. doi:10.1043/0003-9985(2003)127<0364:HIWHAC>2.0.CO;2.
203. Ligabue G, Damiano F, Cuoghi A, et al. p-Cresol and Cardiovascular Risk in Kidney Transplant Recipients. *Transplant Proc.* 2015;47(7):2121-2125. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26361658>. Accessed February 10, 2016.
 204. Vanholder R, Baurmeister U, Brunet P, Cohen G, Glorieux G, Jankowski J. A bench to bedside view of uremic toxins. *J Am Soc Nephrol.* 2008;19(5):863-870. doi:10.1681/ASN.2007121377.
 205. Braun JM, Yolton K, Dietrich KN, et al. Prenatal Bisphenol A Exposure and Early Childhood Behavior. *Environ Health Perspect.* 2009;117(12):1945-1952. doi:10.1289/ehp.0900979.

IX. ANEXOS

Los resultados presentados en esta tesis han sido publicados en:

- The Choice of Hemodialysis Membrane Affects Bisphenol A Levels in Blood. **Bosch-Panadero E**, Mas S, Sanchez-Ospina D, Camarero V, Pérez-Gómez MV, Saez-Calero I, Abaigar P, Ortiz A, Egido J, González-Parra E. J Am Soc Nephrol. 2015 Oct 2. pii: ASN.2015030312
- Importancia del Bisfenol A, una toxina urémica de origen exógeno, en el paciente en hemodiálisis. (*)**Bosch-Panadero E** (1), Sebastian Mas (1), Didier Sanchez-Ospina (2), Vanesa Camarero (3), Vanesa Pérez-Gómez (4) , Isabel Saez-Calero (3), Pedro Abaigar (3), Alberto Ortíz (4) Jesús Egido (4), y Emilio González-Parra (4) .Revista Nefrología 2016. Artículo Editorial.

Otros trabajos publicados durante el desarrollo de la tesis:

- The C-terminal module IV of connective tissue growth factor, through EGFR/Nox1 signaling, activates the NF-κB pathway and proinflammatory factors in vascular smooth muscle cells. Rodrigues-Diez RR, Garcia-Redondo AB, Orejudo M, Rodrigues-Diez R, Briones AM, **Bosch-Panadero E**, Kery G, Pato J, Ortiz A, Salaices M, Egido J, Ruiz-Ortega M. Antioxid Redox Signal. 2015 Jan 1;22(1):29-47. doi: 10.1089/ars.2013.5500

En fase de publicación:

- Ectopic NEFA accumulation in renal cortex is a major contributor to oxidative stress damage in diabetic nephropathy. **Bosch-Panadero E** , Esther Civantos, Gema Medina-Gómez, Pablo Cannata-Ortiz , Miguel A García-Gonzalez, Alberto Ortiz, Jesús Egido, Sebastián Más.
- Sitagliptin ameliorates oxidative stress in diabetic nephropaty via miR200a. A novel Nrf2-regulating miRNA. E.Civantos, **Bosch-Panadero E**, E Ramirez, O Zhenyukh, Jesus Egido, O Lorenzo, Sebastian Mas.

Los resultados de esta tesis han sido parcialmente presentados en las siguientes reuniones científicas:

- Differences in Bisphenol A (BPA) Serum Levels in Hemodialysis (HD) Patients with Two Different Membranes. **Bosch-Panadero E**, SMas,V.Camarero, D.Sanchez-Ospina, V.Perez-Gomez, C.Garcia, I Saez-Calero, P.Abaigar, A.Ortiz, J.Egido, E.Gonzalez-Parra. ASN Kidney Week 2014 Annual Meeting Philadelphia.
- Bishenol A (BPA) serum levels in hemodialysis patients with two different membranes. **Bosch-Panadero E**, Sebastian Mas, Vanesa Camarero, Didier Sanchez-Ospina, Vanesa Perez-Gomez, Monica Pereira, Pedro Abaigar, Jesus Egido, Emilio Gonzalez-Parra. The 30th Annaul Meeting of the Japanese Society of High Performance Membrane for Blood Purification. March 2015.
- Oxidation markers and Bisphenol A (BPA) serum levels relationship in Hemodialysis (HD) patients. **Bosch-Panadero E**, S. Mas, V. Camarero, D. Sanchez-Ospina, V. Pérez-Gómez, M. Pereira, I Saez-Calero, P. Abaigar, J. Egido, E. González-Parra. ERA-EDTA Congress. London 2015
- Bishenol A (BPA) serum levels in hemodialysis patients with two different membranes. **Bosch-Panadero E** , Sebastian Mas, Vanesa Camarero, Didier Sanchez-Ospina, Vanesa Perez-Gomez, Monica Pereira, Pedro Abaigar, Jesus Egido, Emilio Gonzalez-Parra.ERA-EDTA Congress. London 2015

- Relación entre marcadores de inflamación y niveles séricos de bisfenol A en pacientes en hemodiálisis. **Bosch-Panadero E**, S. Mas, V. Camarero, D. Sanchez-Ospina, V. Pérez-Gómez, Carolina Gracia, I Saez-Calero, P. Abaigar, J. Egido, E. González-Parra. SOMANE. Alcála de Henares. Junio 2015
- Relación entre marcadores de inflamación y niveles séricos de bisfenol A en pacientes en hemodiálisis. **Bosch-Panadero E**, S. Mas, V. Camarero, D. Sanchez-Ospina, V. Pérez-Gómez, Carolina Gracia, I Saez-Calero, P. Abaigar, J. Egido, E. González Parra. XLV Congreso de la Sociedad Española de Nefrología. Valencia. Octubre 2015

The Choice of Hemodialysis Membrane Affects Bisphenol A Levels in Blood

Enrique Bosch-Panadero,* Sebastian Mas,*[†] Didier Sanchez-Ospina,[‡] Vanesa Camarero,[§] Maria V. Pérez-Gómez,[¶] Isabel Saez-Calero,[§] Pedro Abaigar,[§] Alberto Ortiz,^{*¶||**} Jesus Egido,^{*†||**} and Emilio González-Parra^{†||**}

*Renal, Vascular and Diabetes Laboratory, and [†]Division of Nephrology and Hypertension, IIS-Fundación Jiménez Díaz Universidad Autónoma de Madrid (UAM), Madrid, Spain; [‡]Spanish Biomedical Research Centre in Diabetes and Associated Metabolic Disorders (CIBERDEM), Madrid, Spain; [§]Division of Nephrology, Hospital Universitario de Burgos, Burgos, Spain; [¶]Red Española de Investigación Renal, Madrid, Spain; ^{||}Department of Medicine, UAM Medical School, Madrid, Spain; and ^{**}Fundación Renal Íñigo Álvarez de Toledo/Instituto Reina Sofía de Investigación en Nefrología, Madrid, Spain

ABSTRACT

Bisphenol A (BPA), a component of some dialysis membranes, accumulates in CKD. Observational studies have linked BPA exposure to kidney and cardiovascular injury in humans, and animal studies have described a causative link. Normal kidneys rapidly excrete BPA, but insufficient excretion may sensitize patients with CKD to adverse the effects of BPA. Using a crossover design, we studied the effect of dialysis with BPA-containing polysulfone or BPA-free polynephron dialyzers on BPA levels in 69 prevalent patients on hemodialysis: 28 patients started on polysulfone dialyzers and were switched to polynephron dialyzers; 41 patients started on polynephron dialyzers and were switched to polysulfone dialyzers. Results were grouped for analysis. Mean BPA levels increased after one hemodialysis session with polysulfone dialyzers but not with polynephron dialyzers. Chronic (3-month) use of polysulfone dialyzers did not significantly increase predialysis serum BPA levels, although a trend toward increase was detected (from 48.8 ± 6.8 to 69.1 ± 10.1 ng/ml). Chronic use of polynephron dialyzers reduced predialysis serum BPA (from 70.6 ± 8.4 to 47.1 ± 7.5 ng/ml, $P < 0.05$). Intracellular BPA in PBMCs increased after chronic hemodialysis with polysulfone dialyzers (from 0.039 ± 0.002 to 0.043 ± 0.001 ng/ 10^6 cells, $P < 0.01$), but decreased with polynephron dialyzers (from 0.045 ± 0.001 to 0.036 ± 0.001 ng/ 10^6 cells, $P < 0.01$). Furthermore, chronic hemodialysis with polysulfone dialyzers increased oxidative stress in PBMCs and inflammatory marker concentrations in circulation. *In vitro*, polysulfone membranes released significantly more BPA into the culture medium and induced more cytokine production in cultured PBMCs than did polynephron membranes. In conclusion, dialyzer BPA content may contribute to BPA burden in patients on hemodialysis.

J Am Soc Nephrol 27: ●●●–●●●, 2015. doi: 10.1681/ASN.2015030312

2,2-Bis-(4-hydroxyphenyl) propane (bisphenol A [BPA]) was synthesized in the 1930s as a synthetic estrogen,^{1,2} but was displaced by diethylstilbestrol. Currently, BPA is a component of polycarbonate plastics and epoxy resins and is considered an environmental toxin. BPA contains aromatic rings with structural similarity to phenols, and BPA metabolism and disposal may have common characteristics with uremic toxins such as p-Cresol.³ BPA may be absorbed in the gastrointestinal tract after ingesting products packed in plastic containers, polycarbonate bottles, or cans of food and

beverages. Like other exogenous phenols, BPA is conjugated by glucuronic acid in the bowel and

Received March 24, 2015. Accepted August 17, 2015.

E.B.-P. and S.M. contributed equally to this work.

Published online ahead of print. Publication date available at www.jasn.org.

Correspondence: Dr. Sebastian Mas, IIS-Fundación Jiménez Díaz, Renal, Vascular and Diabetes Research Laboratory, Av Reyes Católicos 2, Madrid, E-28040, Spain. Email: smas@fjd.es

Copyright © 2015 by the American Society of Nephrology

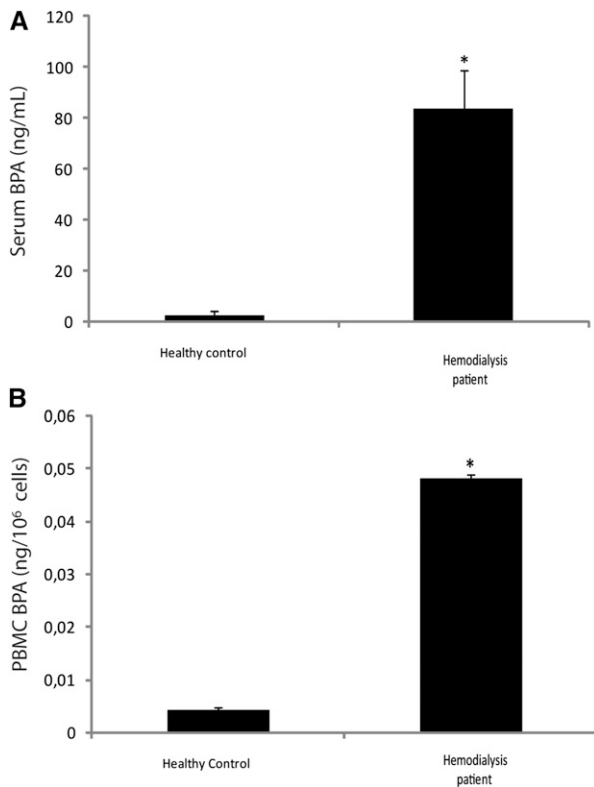


Figure 1. Bisphenol serum and intracellular concentration. (A) Serum and (B) intracellular BPA in healthy controls and patients on hemodialysis. * $P<0.05$ versus control.

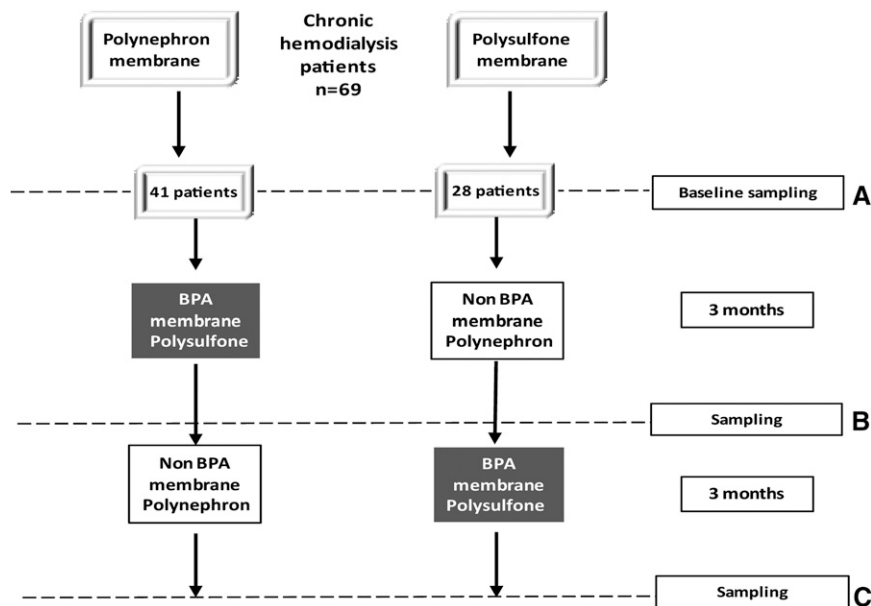


Figure 2. Study design. (A and B) In this crossover study, prevalent patients on hemodialysis were evaluated and sampled at baseline and next switched to a different dialysis membrane for 3 months. At that point, samples were taken and the membrane switched to the baseline one. (C) At 6 months, new sampling took place.

liver and excreted in urine as BPA glucuronide.⁴ In this regard, BPA may also be considered a uremic toxin, because it accumulates in CKD and there is evidence that its accumulation is harmful.³

BPA is a chemical switch in endocrine processes, and may impact reproduction, weight, and development. Very low concentrations of BPA alter steroidogenesis⁵ and cell functions.⁶ In this regard, BPA exposure has been linked to the development of obesity, insulin resistance, metabolic syndrome, diabetes, and atherosclerosis.^{6–9}

An epidemiologic association was observed between high urinary BPA levels and cardiovascular disease. Each increase in urinary BPA of 4.5 $\mu\text{g/L}$ was associated with a 13% increase in the incidence of coronary heart disease within 10 years, although the significance was lost after adjustment for traditional cardiovascular risk factors.¹⁰ In healthy adult Americans, urinary BPA levels $>4 \mu\text{g/L}$ were associated with a 50% increase in the prevalence of hypertension compared with levels $<1.5 \mu\text{g/L}$.¹¹ Urinary BPA levels $>1.4 \mu\text{g/L}$ were associated with a 23% higher risk of microalbuminuria than in healthy adults with levels $<0.5 \mu\text{g/L}$.¹² Experimental studies have identified potential mechanisms of BPA nephrotoxicity through injury of glomerular podocytes, oxidative stress, inflammation, and induction of arterial hypertension.^{13–15}

One argument by government agencies for considering safe the use of BPA in the general population is the almost complete and rapid urinary elimination of the conjugated molecule, which decreases the risks of exposure to BPA.¹⁶ Thus, BPA exposure is assessed as urinary BPA concentration in the general population because serum levels are very low when renal function is normal. However, serum BPA levels increase with decreasing renal function and are highest in individuals on hemodialysis,¹⁷ reflecting the accumulation of BPA in CKD. For this reason, studies on the causes and consequences of BPA accumulation in CKD patients are needed.

BPA is found in the housing (polycarbonate) and/or membranes of some commonly used dialyzers. The amount of BPA in polyester polymer alloy dialyzers is 12.2 $\mu\text{g/g}$, in polysulfone 8–34.5 $\mu\text{g/g}$, in polycarbonate 47.2 $\mu\text{g/g}$, in polymethylmethacrylate 0.008 $\mu\text{g/g}$, in cellulose triacetate 0.008 $\mu\text{g/g}$, and in cellulose 0.016 $\mu\text{g/g}$.^{17,18} BPA is released from dialyzers, although at lower levels than the limits stipulated by health authorities. We have now evaluated in a crossover study the impact of the choice of dialyzer (BPA-free versus BPA-containing) on serum and intracellular BPA levels and on inflammation and oxidative stress markers.

RESULTS

Serum and Intracellular BPA Levels are Higher in Patients on Hemodialysis than in Healthy Controls

Both serum and intracellular BPA were higher in patients on hemodialysis than in healthy controls (35-fold and 12-fold, respectively; Figure 1, A and B).

Polysulfone Membranes Increase Serum BPA Levels Following a Single Hemodialysis Session while Chronic Use of Polynephron Membranes for 3 Months Decreases Serum BPA

In a crossover design, prevalent patients chronically dialyzed with polysulfone (baseline polysulfone, $n=28$) were switched for 3 months to polynephron and then switched back for 3 months to polysulfone (Figure 2). Conversely, patients chronically dialyzed with polynephron (baseline polynephron, $n=41$) were switched for 3 months to polysulfone and then switched back for 3 months to polynephron (Figure 2).

Mean BPA levels increased from 46.3 ± 8.5 ng/ml to 78.4 ± 11.0 ng/ml (68% increase over predialysis baseline values, $P<0.05$) following a single hemodialysis session with polysulfone dialyzers, while no changes were observed with polynephron membranes (Figure 3A). A trend toward an increase in outflow over inflow BPA levels was also observed with polysulfone, but not with polynephron membranes (Supplemental Figure 1).

The continuous use of a polysulfone membrane for 3 months tended to increase predialysis serum mean BPA levels (from 48.8 ± 6.8 to 69.1 ± 10.1 ng/ml, a 44% increase for the combined 0–3 and 3–6 month groups, NS). By contrast, chronic use of polynephron membranes for 3 months reduced predialysis serum BPA (from 70.6 ± 8.4 to 47.1 ± 7.5 ng/ml, a 33% decrease for the combined 0–3 and 3–6 month groups, $P<0.05$; Figure 3B).

A smaller study of shorter duration (3 weeks for each dialyzer) in incident patients disclosed a similar trend toward increased serum BPA levels with polysulfone membranes (Supplemental Figure 2).

Chronic Use of Polysulfone Membranes Increases and of Polynephron Membranes Decreases Intracellular BPA

Chronic hemodialysis with polysulfone membranes for 3 months increased predialysis intracellular BPA in PBMCs

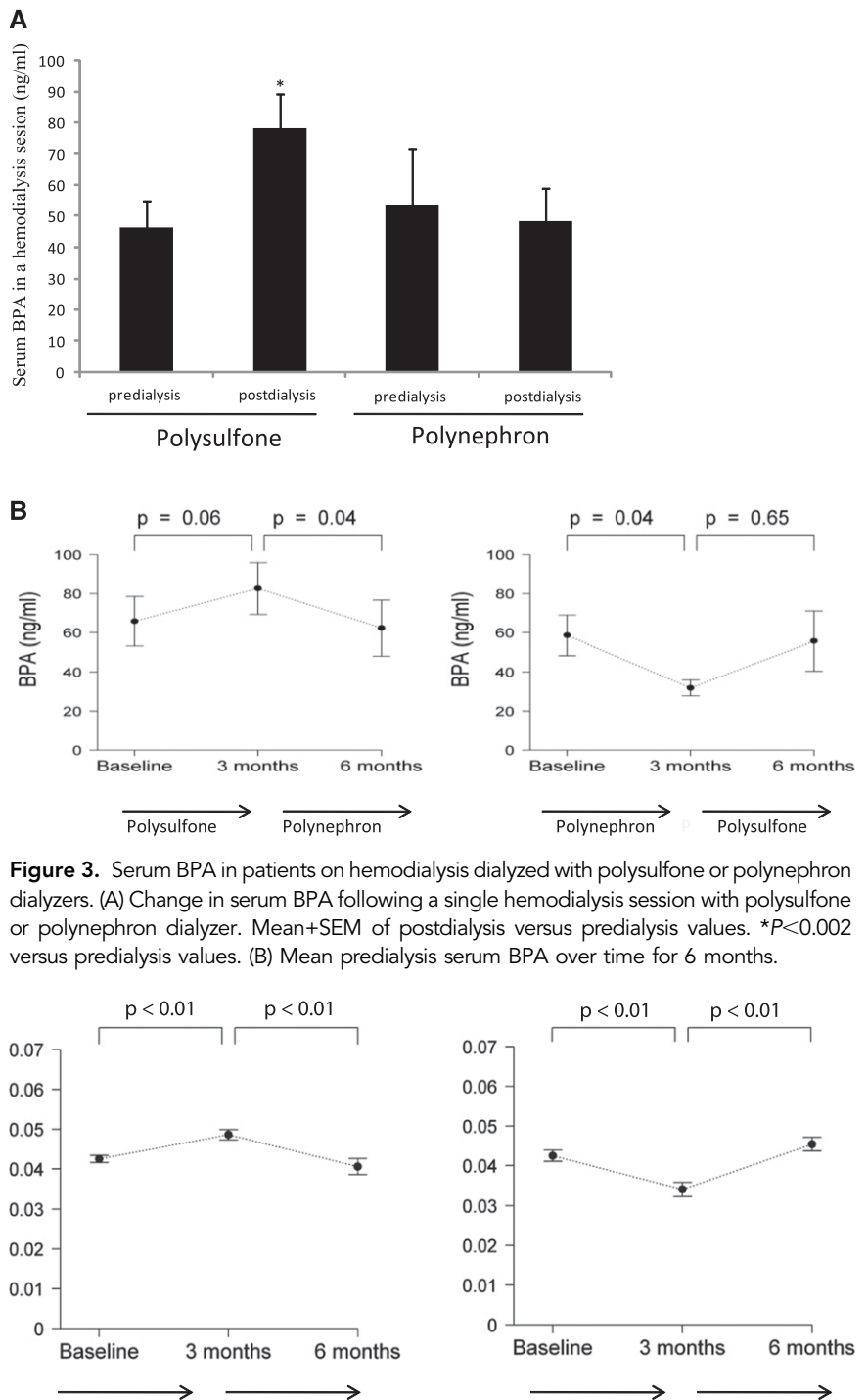


Figure 3. Serum BPA in patients on hemodialysis dialyzed with polysulfone or polynephron dialyzers. (A) Change in serum BPA following a single hemodialysis session with polysulfone or polynephron dialyzer. Mean±SEM of postdialysis versus predialysis values. * $P<0.002$ versus predialysis values. (B) Mean predialysis serum BPA over time for 6 months.

Figure 4. Intracellular BPA in PBMCs from patients on hemodialysis dialyzed with polysulfone or polynephron dialyzers. Predialysis intracellular BPA values over time for 6 months.

(from 0.039 ± 0.002 to 0.043 ± 0.001 ng/10⁶ cells, a 10% increase for the combined 0–3 and 3–6 month groups, $P<0.01$), whereas polynephron membranes decreased intracellular BPA (from 0.045 ± 0.001 to 0.036 ± 0.001 ng/10⁶ cells, a 20% decrease for the combined 0–3 and 3–6 month groups, $P<0.01$; Figure 4).

Oxidative Stress and Inflammation Markers

Oxidative stress markers were measured in 10 randomly selected patients. Oxidative stress activates the nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 (Nrf2) transcription factor, which in turn promotes the expression of genes encoding proteins that protect the cell from oxidative stress, such as heme oxygenase 1 (HO-1) and peroxiredoxin 1 (Prx-1). The expression of oxidative stress markers was significantly higher after 3 months of hemodialysis with polysulfone than with polynephron membranes (Figure 5).

Inflammation markers were assessed in all patients. Three months of hemodialysis with polysulfone membranes increased circulating C-reactive protein (CRP) and IL-6 while polynephron membranes decreased CRP and IL-6 ($P<0.001$; Figure 6).

Changes in the concentration of circulating inflammatory biomarkers correlated with changes in BPA concentrations and both inflammatory markers and serum BPA increased when polysulfone membranes were employed (Figure 7).

BPA and Polysulfone BPA-Containing Membranes Increase Inflammatory Markers in Cultured PBMCs

BPA dose-dependently increased cytokine mRNA expression in cultured PBMCs from healthy donors within a concentration range relevant for patients on hemodialysis (Supplemental Figure 3).

Coincubation of mashed polysulfone dialyzers dose-dependently increased cytokine mRNA expression and secretion in cultured healthy donor PBMCs (Supplemental Figure 4, A–D). In this regard, within 24 hours of culture, BPA was dose-dependently released from polysulfone dialyzer fibers into the culture media (Supplemental Figure 5). Thus, PBMCs may be exposed both to released BPA and to BPA within the membrane surface.

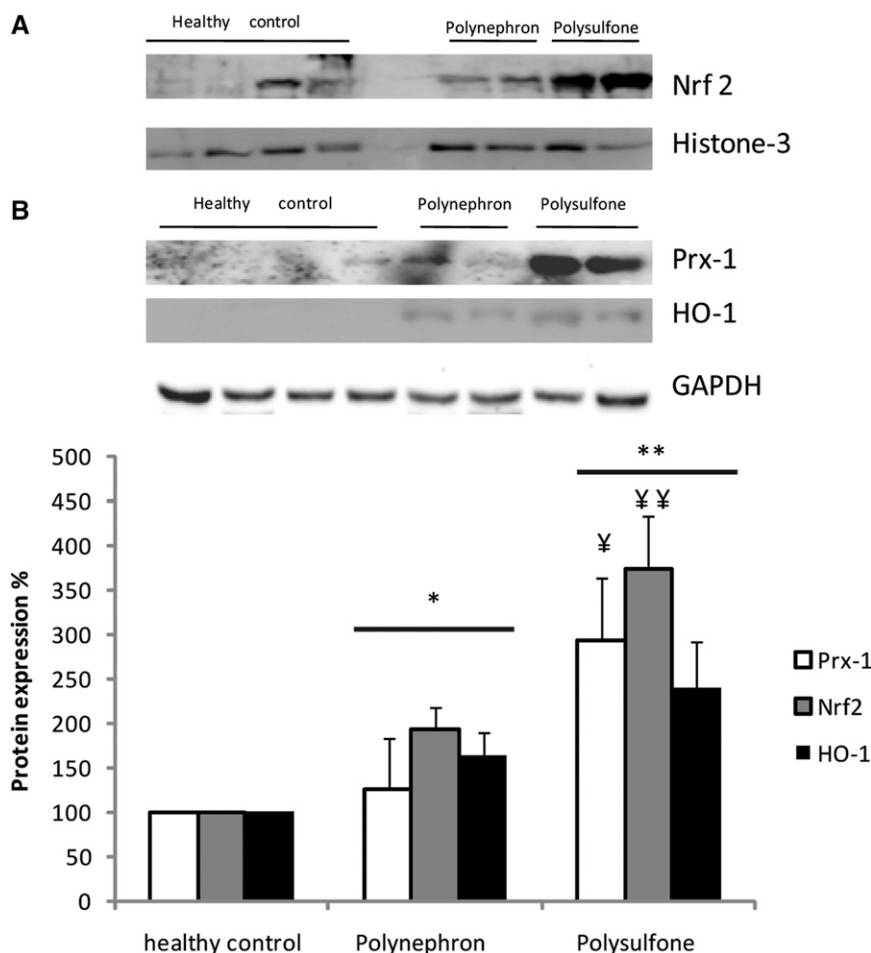


Figure 5. Expression of oxidative stress proteins Nrf2, HO-1, and Prx-1 in PBMCs from patients dialyzed for 3 months with polysulfone or polynephron membranes. (A) Nrf2 Western blot using nuclear fraction and a histone-3 loading control. (B) HO-1 and Prx-1 Western blot using cytosolic fraction and a GAPDH loading control. (C) Quantification of Western blotting results. Values expressed as percentage increase over healthy controls. * $P<0.05$ versus healthy control; ** $P<0.001$ versus healthy control; ¥ $P<0.05$ versus polynephron; ¥¥ $P<0.01$ versus polynephron.

DISCUSSION

This is the first prospective study to evaluate the impact of BPA-free dialyzers on serum BPA levels in patients on hemodialysis when compared with state-of-the-art BPA-containing dialyzers. The main finding is that the choice of dialyzer in terms of BPA content impacts on acute (after a single dialysis session) and chronic (after 3 months of continuous use of the same type of dialyzer) changes in serum BPA levels. This demonstrates that dialyzer BPA content may contribute to BPA burden in patients on hemodialysis. These patients are more sensitive to BPA accumulation and potential toxicity due to the loss of the physiologic BPA excretion mechanisms in urine.

BPA is used in the manufacturing of polycarbonate plastics and epoxy resins. The potential risk of BPA for human health has attracted much attention from regulatory agencies. To date, BPA is still considered safe enough in the general population, despite several red flags, as it is readily excreted in the urine. However, patients on hemodialysis are unable to excrete BPA in their urine,¹⁹ leading to BPA accumulation.²⁰ Repeated loading of BPA during hemodialysis with BPA-containing membranes may aggravate the problem.¹⁷ We have found high serum BPA levels in

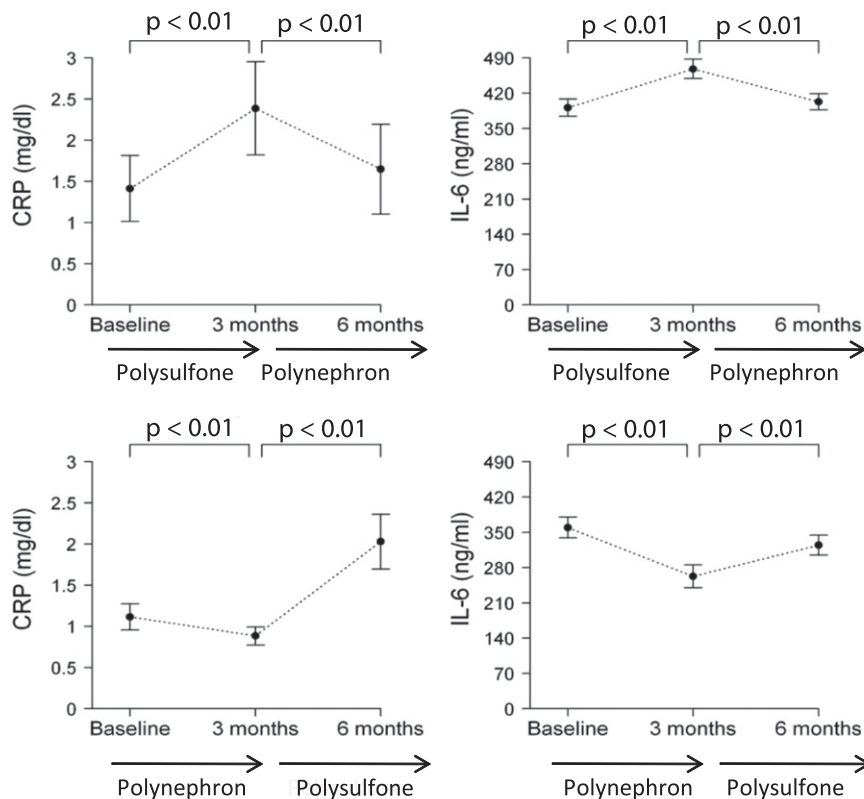


Figure 6. Circulating inflammatory biomarkers in patients dialyzed with polysulfone or polynephron dialyzers for 3 months.

patients on hemodialysis compared with patients with normal renal function, which is consistent with prior observations that serum BPA rises when the GFR falls below 60 ml/min.²¹ In this regard, our data support the concept that patients on hemodialysis represent a high-risk population for BPA overload, which may require special regulatory status with regards to BPA-containing medical devices.

BPA may migrate from dialyzers to the blood of patients on hemodialysis.¹⁶ However, no prospective, long-term studies have assessed the effect of chronic hemodialysis with state-of-the-art dialyzers with different BPA contents. The only similar study in patients on hemodialysis assessed the effect of hemodialysis for 4 weeks on serum BPA.²¹ In this prospective study both dialyzers had BPA-containing polycarbonate housing. Both the short duration of the study and the fact that both dialyzers contained BPA may explain the lack of differences between polysulfone and polynephron membranes.²¹ By contrast, we found differences in serum BPA after 12 weeks of use of BPA-free and BPA-containing dialyzers. Contrary to the 4-week study, the housing in the BPA-free polynephron dialyzers used in our study is also BPA-free. The combination of a longer exposure (3 months versus 1 month) and the use of completely BPA-free dialyzers in one arm of our study allowed the identification of a significant contribution of dialyzer BPA to the BPA burden of patients on hemodialysis. In this regard, in a shorter (3 weeks), smaller ($n=7$) pilot study in incident

patients, the same trend toward increased serum BPA with polysulfone membranes was observed.

Prior studies have also suggested that dialyzer BPA may be released to the circulation, although these were *in vitro* studies or tested outdated membranes in only single-dialysis studies. Thus, a single-pass saline solution flushing released more BPA from polysulfone membrane dialyzers with polycarbonate (BPA-containing) housing than from polysulfone membrane dialyzers with BPA-free polystyrene housing, suggesting a potential role for housing on modulating serum BPA.¹⁸ However, the *in vitro* nature of the study precludes firm conclusions. In another study, a single hemodialysis session resulted in increased serum BPA levels in patients dialyzed with polysulfone but not in those dialyzed with cellulose membranes.²⁰ However, cellulose membranes are now outdated and information is needed on state-of-the-art membranes.

While the molecular mass is 228 D, due to high protein binding, the removal of BPA by hemodialysis is limited.²¹ The protein-bound fraction of plasma BPA in dialysis patients was estimated to be $74\% \pm 5\%$,²¹

similar to *in vitro* estimates of 95% binding at low concentrations.²² Moreover, a tissue:blood partition coefficient of 1.4 for nonadipose tissues and 3.3 for fat tissues further compromises the dialyzability of BPA.²² Thus, the observed decrease in BPA concentration following chronic but not acute dialysis with polynephron dialyzers may have an important component of decreased passage of BPA from the dialyzer into the blood, in addition to any removal of the compound.

Bloodlines are another potential source of BPA. All patients in this study used the same bloodlines made of polyvinyl chloride, (PVC), as they are the only ones currently available in our country. Flexible PVC contains BPA as an additive, although its contribution should be minimal (the manufacturer did not specify the BPA content); therefore, bloodlines are a potential additional source of BPA.

Intracellular BPA levels in PBMCs were higher in patients on hemodialysis than in healthy controls, suggesting that high serum BPA results in intracellular accumulation of the toxins in patients on dialysis. Furthermore, dialysis with polysulfone dialyzers further increased intracellular BPA, suggesting that the BPA burden from dialyzers may reach the intracellular space, where it may modulate gene expression.²³

Our study argues against a significant role of hemodialysis in BPA clearance because no significant reduction of serum BPA was observed following a single dialysis session. This observation is in line with the higher serum BPA levels in patients on

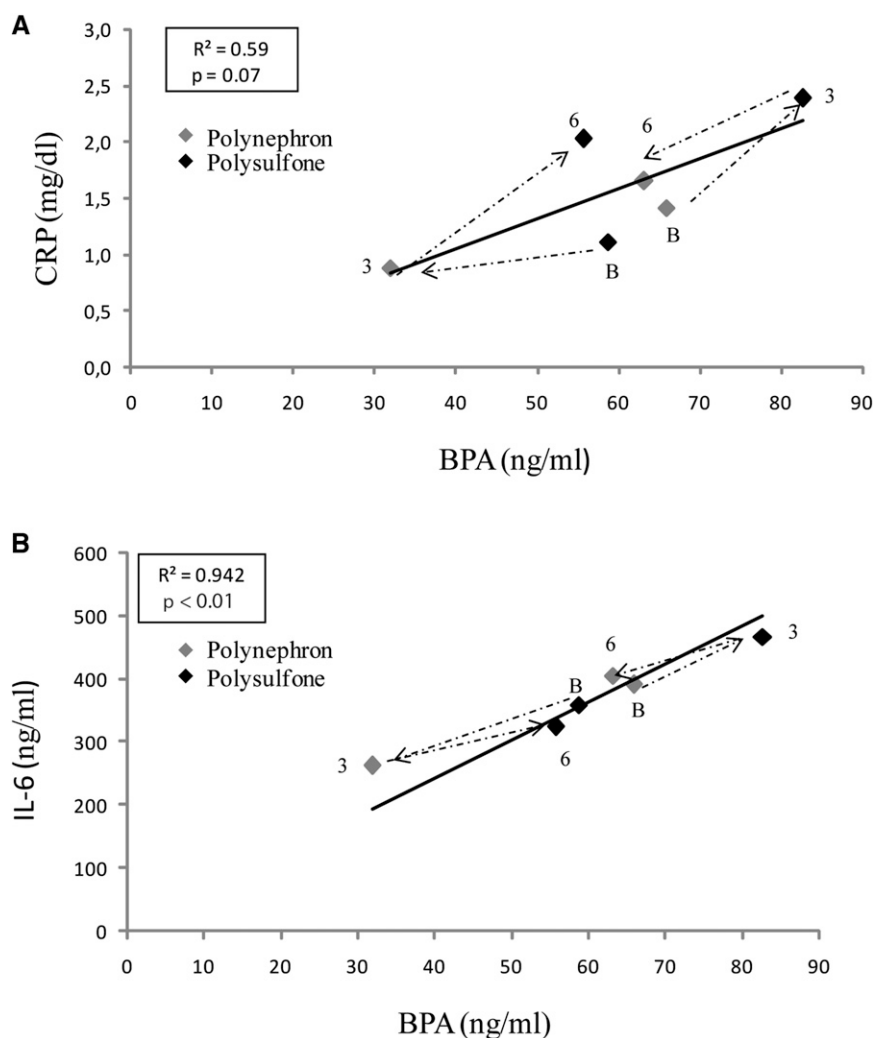


Figure 7. Correlation between serum BPA levels and inflammatory markers. Mean values for each group and time point are shown. BPA and inflammatory markers (A) CRP and (B) IL-6 were assessed in the same samples. Dashed lines represent timelines for the two independent groups. The first data point (B) along the dashed line represents baseline values, the second (3) the 3-month time point, and the third (6) the 6-month time point. Arrows represent the sequence of dialyzers. The dialyzer is color-coded. This was a crossover study of prevalent patients on hemodialysis and each independent study group was dialyzed at baseline with a different dialyzer. Thus, one group changed from polysulfone at baseline to polynephron and back to polysulfone, and the other group changed from polynephron at baseline to polysulfone and back to polynephron.

hemodialysis than in healthy controls. In addition, our results suggest that BPA-containing dialyzers may add to the BPA burden and chronic use of BPA-free dialyzers may decrease serum BPA levels, probably as consequence of decreased release of BPA from the dialyzer itself. Repetitive BPA exposure may lead to BPA accumulation in target organs, because the intravenous route bypasses the first-pass liver metabolism that helps detoxify BPA released from food containers and absorbed from the gastrointestinal tract.

Oxidative stress and inflammation contribute to cardiovascular disease in patients with CKD.²⁴ Advanced CKD is

characterized by increased oxidative stress and low-level systemic inflammation, best assessed by measuring CRP or IL-6.^{25–28} Both uremia itself and hemodialysis sessions may contribute to oxidative stress and inflammation. BPA exposure has been linked to inflammation and cardiovascular disease in humans and BPA induces oxidative stress and inflammation in rodents and cultured cells.^{29,30–33} Oxidative stress was associated with BPA-induced experimental hypertension.¹⁵ BPA induces mitochondrial dysfunction and this has been linked to BPA-associated inflammation.^{34–37} Urinary BPA concentration, a marker of BPA exposure in the general population, is associated with markers of oxidative stress (malondialdehyde and 8-hydroxydeoxyguanosine) and inflammation (white blood cell count and CRP levels) in certain subpopulations such as postmenopausal and pregnant women.^{30,38,39} In this regard, we found evidence of higher oxidative stress and inflammation in patients on hemodialysis dialyzed with BPA-containing polysulfone membranes than with BPA-free polynephron membranes. Inflammation correlated with changes in BPA concentrations in response to the different membranes. The proinflammatory effect of both BPA and BPA-containing membranes was also observed in cultured leukocytes. Furthermore, polysulfone dialyzers released BPA into the cell culture medium. The proinflammatory dose response of BPA encompasses the range of serum BPA values found in dialysis patients. Overall, the *in vitro* findings suggest that the BPA content of dialyzers may impact the inflammatory response of circulating leukocytes *in vivo*.

In conclusion, patients on hemodialysis have higher levels of serum and intracellular BPA than do healthy controls, and the

choice of dialysis membrane impacts on serum and intracellular BPA levels. Dialyzers with BPA-containing membranes increase serum BPA levels over 3 months and even following every single hemodialysis session. The BPA increase after a single hemodialysis session suggests that hemodialysis does not compensate for the lack of urine BPA excretion. Rather, the use of BPA-containing dialysis membranes further adds to the BPA burden of patients on hemodialysis. In contrast, the chronic use of BPA-free dialyzers results in decreased BPA levels. Further studies should reveal the health consequences of BPA accumulation from dialysis membranes in patients

on hemodialysis who cannot excrete excess BPA in urine. Meanwhile, our data suggest that patients on hemodialysis are a high-risk population for BPA overload, which may require special regulatory status with regards to BPA-containing medical devices.

CONCISE METHODS

Clinical Design and Patient Recruitment

In a prospective 6-month, crossover study we compared BPA-free and BPA-containing dialyzers in 69 prevalent patients on hemodialysis. BPA-free high-flux polynephron (polynephron) membranes housed in polypropylene (Eliseo; Nipro Corp., Osaka, Japan) were compared with high-flux polysulfone (polysulfone) dialyzers that contain BPA (Fxx80; Fresenius, Bad Homburg, Germany). The study was approved by the IIS-Fundación Jiménez Díaz Ethics Committee. Patients were enrolled after providing written informed consent.

Inclusion criteria were as follows: age >18 years; hemodialysis vintage >3 months; diuresis <0.5 L/24 h; informed consent; and absence of active inflammatory, infectious, or malignant diseases at the initiation or during the study. Baseline sampling and data were collected at consent. Two groups of patients were initially dialyzed for 3 months with a dialyzer different from the one they were previously using (prestudy dialyzer polynephron in 41 patients and polysulfone in 28 patients), and after 3 months blood was sampled predialysis and patients changed to the other dialyzer (crossover) for 3 months. A third predialysis blood sample was obtained at the end of the study (Figure 2). Bloodlines were made of PVC (Fresenius Medical Care) in all cases. Baseline patient clinical and biochemic basal characteristics are shown in Table 1. In 21 randomly selected patients, intracellular BPA was also measured. A healthy, age- and sex-matched control group with normal renal function was also studied.

Dialysis was performed three times a week, with a blood flow >300 ml/min, and ultrapure dialysate flow 500 ml/min. Fasting blood samples were drawn just prior to a midweek dialysis treatment from the arteriovenous fistula and frozen at -80°C . Blood from ten patients was sampled before (predialysis) and after (postdialysis) a single dialysis session to determine BPA changes in one session using polynephron and in other session using polysulfone dialyzers. In addition, blood was sampled at the inflow and outflow of the dialyzer in five patients.

Basic demographic characteristics and clinical data (age, sex, hemodialysis vintage, and BP), Kt/V urea, and basic serum biochemistry parameters (calcium, phosphate, parathormone, vitamin D, cholesterol, triglycerides, CRP, IL-6, and PBMC oxidative stress markers Nrf2, PRX-1, and HO-1) were assessed.

A pilot ($n=7$ patients) study in incident patients on hemodialysis (Supplemental Table 1) evaluated serum BPA levels at baseline and following three weeks of dialysis with polysulfone and then polynephron membranes.

PBMCs

For cocubation experiments and intracellular BPA measurements, 10 ml of peripheral blood were obtained from healthy volunteers

Table 1. Baseline clinical and biochemical characteristics

	N	Mean	SD
Age	69	65	13
Dialysis vintage (months)	69	63	92
Kt/V urea	68	1.54	0.38
White blood cells (thousands/ μl)	69	5.6	1.6
Hemoglobin (g/dl)	69	11.5	1.3
25-OH-vitamin D (ng/ml)	64	16	10
Total proteins (g/dl)	69	6.6	0.5
Albumin (g/dl)	69	3.76	0.59
Calcium (mg/dl)	69	9.1	0.5
Phosphate (mg/dl)	69	4.8	1.5
Cholesterol (mg/dl)	69	154	36
Triglycerides (mg/dl)	69	127	75
CRP (mg/dl)	69	8.6	14.2
Parathormone (pg/ml) ^a	69	235	123–414
EPO dose (U/week)	62 of 69 (90%)	5199	7724
Calcium-based P binders (mg/day)	20 of 69 (29%)	1329	859
Sevelamer (mg/day)	33 of 69 (48%)	4388	2601
Lanthanum (mg/day)	23 of 69 (33%)	2641	764
Magnesium-based P binders (mg/day)	8 of 69 (12%)	822	397

EPO, erythropoietin; P, phosphate.

^aMedian and interquartile range shown.

(blood bank, IIS-Fundacion Jimenez Diaz) after informed consent. Blood was drawn into EDTA tubes and cells were collected and used for isolation of PBMCs by Ficoll density gradient centrifugation.⁴⁰

BPA Assessment

BPA was measured by a high-sensitivity ELISA (Abnova), following the manufacturer's instructions. The intra- and interassay coefficients of variation were 6.5% and 10.5%, respectively. For intracellular BPA measurements, PBMCs were resuspended in 100 μl lysis buffer (Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, EDTA 2 mM, EGTA 2 mM, Triton X-100 0.2%, NaF 0.2%, NP-40, and PMSF 0.1 mM).

Cell Culture

PBMCs were washed, counted, and adjusted to $2\text{--}4 \times 10^6$ cells $\cdot\text{ml}^{-1}$ in culture medium RPMI 1640 supplemented with 1% FBS containing 100 U/ml⁻¹ of penicillin 100 $\mu\text{g}/\text{ml}^{-1}$. PBMCs were incubated with different amounts of both mashed dialyzers extracts (polynephron and polysulfone) or BPA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) for 24 hours.

RNA and Protein Extraction

Total RNA was obtained using the Tripure isolation reagent (Roche Diagnostic GmbH, Mannheim, Germany) according to the manufacturer's instructions. The quantity and purity of extracted RNA was assessed by measuring absorbance at 260 nm and the ratio A260:A280 in a UV spectrophotometer (NanoDrop Inc., Wilmington, DE). Only samples with an A260:A280 ratio up to 1.8 were considered valid for real-time PCR. Nrf2 translocation analysis were performed using NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents (Thermo Fisher Scientific) according to the manufacturer's instructions.

RT-PCR and Real-Time PCR

Synthesis of cDNA by RT-PCR, and quantitative real-time PCR were performed as described previously.⁴¹ Multiplex real-time PCR was performed using Applied Biosystems expression assays for IL-6 (Hs00174131_m1) and TNF- α (Hs00174128_m1). Data were normalized with 18S eukaryotic ribosomal RNA expression (4310893E).

Protein Quantitation

ELISA or Western blotting was used to assess protein levels. ELISA kits were used to quantify IL-6 and TNF- α (Preprotech) according to the manufacturer's instructions. Western blotting was performed on PBMC nuclear and cytoplasmic lysates using 30 μ g protein per lane. Primary antibodies were rabbit anti-human Nrf2 (1:500, sc-722, Santa Cruz Biotechnology), anti-HO-1 (1:1000, SPA-896, Enzo), anti-Prx-1 (1:200, sc-21948, Santa Cruz Biotechnology), anti-GAPDH (1:5000, MAB 374; EMD Millipore), and anti-histone 3 (EMD Millipore, 09-838, 1:1000), and secondary antibodies were horseradish peroxidase-labeled anti-mouse (DAKO Cytomation) or anti-rabbit (Santa Cruz Biotechnology). Quantitation was performed using ImagenQuant TL software (GE healthcare) after image acquisition on an Image Quant LAS 4000 system (GE Healthcare).

Statistical Analyses

Variables were described at baseline and at 3- and 6-month follow-up for each arm of the study as mean and SEM. Changes from baseline to 3 months and from 3 months to 6 months were calculated for each line of treatment. In addition, pooled data encompassing both periods using the same dialyzer (the 0–3 months on one dialyzer of patients on one arm of the study and the 3–6 months on the same dialyzer of patients on the other arm of the study) were also analyzed. Comparisons between values were performed using paired sample *t* test or Wilcoxon signed-rank test. All comparisons used the bilateral hypothesis test and a significance level of 0.05.

ACKNOWLEDGMENTS

A.O. received funding from Programa Intensificación Actividad Investigadora (ISCIII/Agencia Lain-Entralgo/CM). This work was supported by a grant from Nipro corporation. Renal, vascular and diabetes laboratory get funding from the Spanish government: PI13/00047, MS12/03262, CP10/00479, PI13/00802, and PI14/00883; European Regional Development Fund (ERDF/FEDER) grants (ISCIII-RETIC RED in REN/RD06/0016, and RD12/0021), Comunidad de Madrid (S2010/BMD-2378), Spanish Nephrology Society (SENEFRO), and Fundación Renal Íñigo Álvarez de Toledo (FRIAT).

DISCLOSURES

This study was funded by a grant from Nipro corporation. The funders had no role in the design of the study, interpretation of the results, or the writing of the manuscript.

REFERENCES

- Casajua N, Lacorte S: New methodology for the determination of phthalate esters, bisphenol A, bisphenol A diglycidyl ether, and non-ylphenol in commercial whole milk samples. *J Agric Food Chem* 52: 3702–3707, 2004
- Dodds EC, Goldberg L, Lawson W, Robinson R: OEstrogenic Activity of Certain Synthetic Compounds. *Nature* 141: 247–248, 1938
- González-Parra E, Herrero JA, Elewa U, Bosch RJ, Arduán AO, Egido J: Bisphenol a in chronic kidney disease. *Int J Nephrol* 2013: 437857, 2013
- Dekant W, Völkel W: Human exposure to bisphenol A by biomonitoring: methods, results and assessment of environmental exposures. *Toxicol Appl Pharmacol* 228: 114–134, 2008
- Castro B, Sánchez P, Torres JM, Preda O, del Moral RG, Ortega E: Bisphenol A exposure during adulthood alters expression of aromatase and 5 α -reductase isozymes in rat prostate. *PLoS ONE* 8: e55905, 2013
- Vandenberg LN, Chahoud I, Heindel JJ, Padmanabhan V, Paumgarten FJ, Schoenfelder G: Urinary, circulating, and tissue biomonitoring studies indicate widespread exposure to bisphenol A. *Environ Health Perspect* 118: 1055–1070, 2010
- Kim ME, Park HR, Gong EJ, Choi SY, Kim HS, Lee J: Exposure to bisphenol A appears to impair hippocampal neurogenesis and spatial learning and memory. *Food Chem Toxicol* 49: 3383–3389, 2011
- Lang IA, Galloway TS, Scarlett A, Henley WE, Depledge M, Wallace RB, Melzer D: Association of urinary bisphenol A concentration with medical disorders and laboratory abnormalities in adults. *JAMA* 300: 1303–1310, 2008
- Yang Y-J, Lee S-Y, Kim K-Y, Hong Y-P: Acute testis toxicity of bisphenol A diglycidyl ether in Sprague-Dawley rats. *J Prev Med Pub Health* 43: 131–137, 2010
- Li M, Bi Y, Qi L, Wang T, Xu M, Huang Y, Xu Y, Chen Y, Lu J, Wang W, Ning G: Exposure to bisphenol A is associated with low-grade albuminuria in Chinese adults. *Kidney Int* 81: 1131–1139, 2012
- Boeniger MF, Lowry LK, Rosenberg J: Interpretation of urine results used to assess chemical exposure with emphasis on creatinine adjustments: a review. *Am Ind Hyg Assoc J* 54: 615–627, 1993
- You L, Zhu X, Shrubsole MJ, Fan H, Chen J, Dong J, Hao CM, Dai Q: Renal function, bisphenol A, and alkylphenols: results from the National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES 2003–2006). *Environ Health Perspect* 119: 527–533, 2011
- Gowder SJT: Nephrotoxicity of bisphenol A (BPA)—an updated review. *Curr Mol Pharmacol* 6: 163–172, 2013
- Olea-Herrero N, Arenas MI, Muñóz-Moreno C, Moreno-Gómez-Toledano R, González-Santander M, Arribas I, Bosch RJ: Bisphenol-A induces podocytopathy with proteinuria in mice. *J Cell Physiol* 229: 2057–2066, 2014
- Saura M, Marquez S, Reventun P, Olea-Herrero N, Arenas MI, Moreno-Gómez-Toledano R, Gómez-Parrizas M, Muñóz-Moreno C, González-Santander M, Zaragoza C, Bosch RJ: Oral administration of bisphenol A induces high blood pressure through angiotensin II/CaMKII-dependent uncoupling of eNOS. *FASEB J* 28: 4719–4728, 2014
- Shintani H: Determination of the endocrine disrupter bisphenol-A in the blood of uremia patients treated by dialysis. *Chromatographia* 53: 331–333, 2001
- Haishima Y, Hayashi Y, Yagami T, Nakamura A: Elution of bisphenol-A from hemodialyzers consisting of polycarbonate and polysulfone resins. *J Biomed Mater Res* 58: 209–215, 2001
- Yamasaki H, Nagake Y, Makino H: Determination of bisphenol a in effluents of hemodialyzers. *Nephron* 88: 376–378, 2001
- Hengstler JG, Foth H, Gebel T, Kramer PJ, Lilienblum W, Schweinfurth H, Völkel W, Wollin KM, Gundert-Remy U: Critical evaluation of key evidence on the human health hazards of exposure to bisphenol A. *Crit Rev Toxicol* 41: 263–291, 2011
- Murakami K, Ohashi A, Hori H, Hibiya M, Shoji Y, Kunisaki M, Akita M, Yagi A, Sugiyama K, Shimozato S, Ito K, Takahashi H, Takahashi K,

- Yamamoto K, Kasugai M, Kawamura N, Nakai S, Hasegawa M, Tomita M, Nabeshima K, Hiki Y, Sugiyama S: Accumulation of bisphenol A in hemodialysis patients. *Blood Purif* 25: 290–294, 2007
21. Krieter DH, Canaud B, Lemke HD, Rodriguez A, Morgenroth A, von Appen K, Dragoun GP, Wanner C: Bisphenol A in chronic kidney disease. *Artif Organs* 37: 283–290, 2013
 22. Csanády GA, Oberste-Frielinghaus HR, Semder B, Baur C, Schneider KT, Filser JG: Distribution and unspecific protein binding of the xenoestrogens bisphenol A and daidzein. *Arch Toxicol* 76: 299–305, 2002
 23. Tarapore P, Ying J, Ouyang B, Burke B, Bracken B, Ho SM: Exposure to bisphenol A correlates with early-onset prostate cancer and promotes centrosome amplification and anchorage-independent growth in vitro. *PLoS ONE* 9: e90332, 2014
 24. Stenvinkel P, Ketteler M, Johnson RJ, Lindholm B, Pecoits-Filho R, Riella M, Heimbürger O, Cederholm T, Girndt M: IL-10, IL-6, and TNF- α : central factors in the altered cytokine network of uremia—the good, the bad, and the ugly. *Kidney Int* 67: 1216–1233, 2005
 25. Chertow GM, Soroko SH, Paganini EP, Cho KC, Himmelfarb J, Ikizler TA, Mehta RL: Mortality after acute renal failure: models for prognostic stratification and risk adjustment. *Kidney Int* 70: 1120–1126, 2006
 26. Cruz DN, de Cal M, Ronco C: Oxidative stress and anemia in chronic hemodialysis: the promise of bioreactive membranes. *Contrib Nephrol* 161: 89–98, 2008
 27. Elewa U, Sanchez-Niño MD, Martin-Cleary C, Fernandez-Fernandez B, Egido J, Ortiz A: Cardiovascular risk biomarkers in CKD: the inflammation link and the road less traveled. *Int Urol Nephrol* 44: 1731–1744, 2012
 28. Schindler R: Causes and therapy of microinflammation in renal failure. *Nephrol Dial Transplant*. 19[Suppl 5]: V34–V40, 2004
 29. Ooe H, Taira T, Iguchi-Ariga SMM, Ariga H: Induction of reactive oxygen species by bisphenol A and abrogation of bisphenol A-induced cell injury by DJ-1. *Toxicol Sci* 88: 114–126, 2005
 30. Watkins DJ, Ferguson KK, Anzalota Del Toro LV, Alshawabkeh AN, Cordero JF, Meeker JD: Associations between urinary phenol and paraben concentrations and markers of oxidative stress and inflammation among pregnant women in Puerto Rico. *Int J Hyg Environ Health* 218: 212–219, 2015
 31. Xin F, Jiang L, Liu X, Geng C, Wang W, Zhong L, Yang G, Chen M: Bisphenol A induces oxidative stress-associated DNA damage in INS-1 cells. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen* 769: 29–33, 2014
 32. Aboul Ezz HS, Khadrawy YA, Mourad IM: The effect of bisphenol A on some oxidative stress parameters and acetylcholinesterase activity in the heart of male albino rats. *Cytotechnology* 67: 145–155, 2015
 33. Fang C, Ning B, Waqar AB, Niimi M, Li S, Satoh K, Shiomi M, Ye T, Dong S, Fan J: Bisphenol A exposure enhances atherosclerosis in WHHL rabbits. *PLoS ONE* 9: e110977, 2014
 34. Jiang Y, Liu J, Li Y, Chang H, Li G, Xu B, Chen X, Li W, Xia W, Xu S: Prenatal exposure to bisphenol A at the reference dose impairs mitochondria in the heart of neonatal rats. *J Appl Toxicol* 34: 1012–1022, 2014
 35. Kaur K, Chauhan V, Gu F, Chauhan A: Bisphenol A induces oxidative stress and mitochondrial dysfunction in lymphoblasts from children with autism and unaffected siblings. *Free Radic Biol Med* 76: 25–33, 2014
 36. Lin Y, Sun X, Qiu L, Wei J, Huang Q, Fang C, Ye T, Kang M, Shen H, Dong S: Exposure to bisphenol A induces dysfunction of insulin secretion and apoptosis through the damage of mitochondria in rat insulinoma (INS-1) cells. *Cell Death Dis* 4: e460, 2013
 37. Xia W, Jiang Y, Li Y, Wan Y, Liu J, Ma Y, Mao Z, Chang H, Li G, Xu B, Chen X, Xu S: Early-life exposure to bisphenol a induces liver injury in rats involvement of mitochondria-mediated apoptosis. *PLoS ONE* 9: e90443, 2014
 38. Babu S, Uppu S, Claville MO, Uppu RM: Prooxidant actions of bisphenol A (BPA) phenoxyl radicals: implications to BPA-related oxidative stress and toxicity. *Toxicol Mech Methods* 23: 273–280, 2013
 39. Yang YJ, Hong YC, Oh SY, Park MS, Kim H, Leem JH, Ha EH: Bisphenol A exposure is associated with oxidative stress and inflammation in postmenopausal women. *Environ Res* 109: 797–801, 2009
 40. Simon TM, Lorber A, Holmes HT: A rapid method for preparing Ficoll-hypaque step gradients and gradient overlays. *J Immunol Methods* 12: 193–195, 1976
 41. Mas S, Martínez-Pinna R, Martín-Ventura JL, Pérez R, Gomez-Garre D, Ortiz A, Fernandez-Cruz A, Vivanco F, Egido J: Local non-esterified fatty acids correlate with inflammation in atheroma plaques of patients with type 2 diabetes. *Diabetes* 59: 1292–1301, 2010

This article contains supplemental material online at <http://jasn.asnjournals.org/lookup/suppl/doi:10.1681/ASN.2015030312/-/DCSupplemental>.